

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

TESE DOUTORADO

O EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO *DOWNHILL* SOBRE A
MODULAÇÃO DOS SUBTIPOS DE MACRÓFAGOS NO MÚSCULO
TRÍCEPS DE CAMUNDONGOS

Aluno: André Luis Araujo Minari

Orientador: Prof. Dr: Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos

SÃO PAULO, 2018

ANDRÉ LUIS ARAUJO MINARI

**O EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO *DOWNHILL* SOBRE A
MODULAÇÃO DOS SUBTIPOS DE MACRÓFAGOS NO MÚSCULO
TRÍCEPS DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada a Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr: Ronaldo Vagner Thomatieli dos
santos

SÃO PAULO, 2018

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

nAChR-7 α	Receptor Nicotínico de Acetilcolina 7-alpha
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato
ANOVA	Análise de Variância
CD	Cluster de Diferenciação
CCR2-C	C Receptor Quimiotático tipo 2
CK	Creatina Quinase
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ED1 ⁺	Anticorpo utilizado para marcar receptores CD68
ED2 ⁺	Anticorpo utilizado para marcar receptores CD163
FCR	Receptor Fc
GAST	Gastrocnêmio
G6PDH	Glicose 6 Fosfato Desidrogenase
HIF-1	Fator Indutor de Hipóxia - 1
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-1Ra	Receptor Antagonista da Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
iNOS	Fator Indutor de Óxido Nítrico
JAK/STAT	Via da Janus Quinase/Via das Estatinas
LDH	Lactato Desidrogenase
LIEF	Lesão Induzida pelo Exercício Físico
LPS	Lipopolissacarídeo
M ϕ	Macrófago
MCP-1	Proteína de Quimioatração de Monócitos e M ϕ s

MHC-I	Complexo Maior de Imunohistocompatibilidade I
MHC-II	Complexo Maior de Imunohistocompatibilidade II
MO	Monócitos
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de Sódio
NFκB	Fator Nuclear Kappa B
NO	Óxido Nítrico
PGE ₂	Prostaglandina-2
PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma
QUAD	Quadríceps
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
SLPI	Inibidor de Leucoproteinases de Atividade Secretória
SOCS	Supressor da Sinalização de Citocinas
STAT 3	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição 3
TGF-α	Fator de Transformação e Crescimento-alfa
TGF-β	Fator de transformação de crescimento-beta
TH1	Linfócito T Auxiliar do Tipo-1
TH2	Linfócito T Auxiliar do Tipo-2
TA	Tibial Anterior
TB	Tríceps Braquial
TLRs	Receptor do Tipo TOLL
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os professores que desde o ensino médio me ensinaram a entender de modo crítico como a política está envolvida em todas as esferas da sociedade e em nossas escolhas.

Agradeço as estudantes e cientistas brasileiros que nos últimos anos não se calaram diante ao desmantelamento da ciência brasileira e do ensino público e gratuito.

Ao professor doutor Elisaldo Carline que dedicou 50 anos de pesquisas e hoje aos 88 anos ainda sofre perseguição política diante de um governo sem qualquer legitimidade nacional e internacional devido suas iniciativas antidemocráticas.

“O pior analfabeto é o analfabeto político. Ele não ouve, não fala, nem participa dos acontecimentos políticos. Ele não sabe que o custo de vida, o preço do feijão, do peixe, da farinha, do aluguel, do sapato e do remédio dependem das decisões políticas. O analfabeto político é tão burro que se orgulha e estufa o peito dizendo que odeia a política. Não sabe o imbecil que, da sua ignorância política, nasce a prostituta, o menor abandonado, e o pior de todos os bandidos, que é o político vigarista, pilantra, corrupto e lacaio das empresas nacionais e multinacionais”.

Bertolt Brecht

“QUANDO TIVER QUE ESCOLHER ENTRE ESTAR CERTO E SER GENTIL
ESCOLHA SER GENTIL”.

AUGUST PULLMAN

Agradeço a minha família, já estivemos mais próximos. Hoje nos encontramos espalhados especialmente ao meu irmão Waldemar minha irmã Elaine, minha mãe Clarice e meus sobrinhos.

Ao meu falecido tio Paulo Varella Nunes principalmente por ter me dado a oportunidade de poder estudar e diminuir ao menos um pouco as diferenças de oportunidade abissais do nosso sistema de educação brasileiro.

As minhas tias, tia Cristina, Zélia, Maria Regina, por se esforçarem de coração a serem tias próximas, mesmo sem muito a oferecer.

Ao meu pai Luiz Gonzaga Minari, que mesmo nas dificuldades da vida se esforçou em deixar sinais positivos da sua presença e sempre me lembrar que ainda existe uma espiritualidade nas pessoas.

Aos meus primos mais próximos, Roberto e Felipe Minari cada um qual do seu jeito.

Agradeço aos meus amigos, companheiros de casa: Mario, Gabriel, Damiao e Pedro. Apesar de tantas diferenças eles são as provas vivas que morar em república é além de tudo democrático!!

Agradeço aos meus velhos e bons amigos Inácio, Raquel e Liliane, Daniel pois mesmo fisicamente distantes estão presentes no meu dia a dia.

A Marcela Vianna e a Mônica Machado, minhas amigas especiais que sempre estão prontas a discutir política e ideologia de gênero. Um agradecimento especial também porque sei que sempre vou ter um colchão em Florianópolis.

A minha segunda família Pontes, Yalis, Bruno, Raul, Rafael e Cassiano.

À Dellen, agradeço todos os anos de amizade e companheirismo e por ser tão especial e marcar importante presença na minha vida!! Na graduação, no mestrado, no doutorado, na França. Obrigado por tudo.

Aos meus amigos da psicologia, Joao Godoy, Paulo Bevilacqua, Bruno Maia. Sinto falta das nossas conversas sobre comportamento, filosofia e política.

Aos meus amigos de laboratório Diego, Juliana, Jansen, Sarah e Flávia, pelo companheirismo e encontros após o expediente.

Ao meu amigo Martins LaiKO, por nossas conversas durante as corridas e barras.

“Quando eu cansei, eu dormi”

“Quando eu tinha fome, eu comi”

“Quando eu tinha que ir, você sabe eu FUI! ”

Forrest Gump.

Aos meus amigos de laboratório e companheiros de grupo: Edgar, Raquel, Camila Maria, Marcos Mônico e Marcus Vinicius, Rafael Chagas Aline Caris e Felipe Melo.

A todas as funcionárias e alunas do 3º andar que se tornaram grandes amigas, a Kenia, Ananda, Marion, Cinthia, Nádia, Adriana, Diva e Joice.

Agradeço à Profa. Daniele do Departamento de Imunologia e Parasitologia da UNIFESP e de seu aluno Jethe.

Agradeço à Profa Hanna Karen Moreira Antunes, por sua atenção e disponibilidade. Obrigado.

Agradeço, ainda à Profa Lila do Departamento de Fisiologia da UNIFESP pela forma como me recebeu no início e continua me recebendo de braços abertos em seu laboratório. Ao Valter e todos os colegas e membros do Laboratório coordenado pela Profa Lila pois sempre foram atenciosos e receptivos.

Agradeço a Profa. Marilia Seelaender, do ICB da USP por ceder seu laboratório para que eu realizasse os experimentos necessários, especialmente as dosagens de citocinas.

A Profa Benedict Chazaud que me recepcionou tão bem em Lyon e todos os amigos que fiz no laboratório INSERN do Instituto de Neuromyogenese da Universidade

Claude Bernard. Obrigado Aurelie, Daniel Robinson, Jéssica, Thibaut e Julian por todo o suporte que me deram no laboratório!

À Michelle que, apesar do meu francês insipiente, pacientemente me acompanhou e ensinou a realizar todos os experimentos no laboratório INSERN.

Ao meu grande amigo Jimmy Massanet pelos cafés e ajuda no laboratório. Um amigo que fiz e vou levar para a vida. Obrigado por tudo.

Ao meu amigo e orientador Ronaldo um agradecimento especial. Se eu consegui o que consegui até hoje grande parte dos meus “pequenos feitos” foram devido a sua ajuda e orientação.

“É melhor escrever errado a coisa certa do que escrever certo a coisa errada”

Ariano Suassuna

Agradeço aos alunos da pós-graduação em psicobiologia por protagonizarem discussões que fizeram parte da minha formação.

A meus amigos que conheci em Lyon Felipe Sierra, Yasi, Jules Asencio, Candice e Colline que dividi pouco, porém importantes momentos.

Agradecimento aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP (2014/04504-6 e 2016/06817-7) cujas concessões de bolsa de estudos e financiamento permitiram realização dessa Tese e de um sonho.

SUMÁRIO

Sumário

AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO	X
SUMÁRIO	X
LISTA DE FIGURAS	XI
ABSTRACT	XII
RESUMO.....	XIII
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO-I	2
1-REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1.1-SISTEMA IMUNOLÓGICO, SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCÍTICO E HETEROGENEIDADE DE MACRÓFAGOSS.....	2
1.2- PROCESSOS DE LESÃO E REGENERAÇÃO MUSCULAR	7
1.3- LESÃO INDUZIDA PELO EXERCÍCIO FÍSICO (LIEF)	14
CAPÍTULO II.....	17
2-OBJETIVOS E HIPÓTESE.....	17
2.1- OBJETIVO GERAL:	17
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	17
2.3- HIPÓTESE:	17
CAPÍTULO III.....	18
3-MÉTODOS.....	18
3.1 – MODELO DE ESTUDO:	18
3.2- ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	18
3.3-PROTOCOLO DE LESÃO INDUZIDA PELO EXERCICIO FÍSICO (LIEF) E EUTANÁSIA	19
3.4- IMUNO-HISTOQUÍMICA	20
3.5-ISOLAMENTO DE MARCAÇÃO DOS MACRÓFAGOSS MUSCULARES.....	21
3.6-MULTIPLEX.....	22
3.7-EXPRESSÃO PROTEICA (<i>WESTERN BLOT</i>).	22
3.8-ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
CAPÍTULO IV	24
4.0-RESULTADOS	24
CAPITULO V	32
5.0-DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:	32
5.1- DISCUSSÃO.....	32
5.2- CONCLUSÃO	53

ANEXO-I	54
APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA.....	54

Lista de figuras

FIGURA 1. ENVOLVIMENTO DOS MONÓCITOS E MΦS APÓS LESÃO MUSCULAR INDUZIDA.	10
FIGURA 2. INTERVENÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA NOS PROCESSOS DE LESÃO E REGENERAÇÃO MUSCULAR.....	13
FIGURA 3. DESENHO EXPERIMENTAL.	19
FIGURA 4. IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS POSITIVAS PARA F4/80.	21
FIGURA 5. ESTRATÉGIA DE GATING PARA AS SUBPOPULAÇÕES DE MΦS LY6C+ AND LY6- NO TB TRÊS DIAS APÓS O PROTOCOLO DOWNHILL.	22
FIGURA 6. CÉLULAS F4/80 POSITIVAS.	24
FIGURA 7. FREQUÊNCIA DE MΦS TOTAIS NO MÚSCULO TB.	25
FIGURA 8. TOTAL DE CÉLULAS CD45+ NO MÚSCULO TB. O GATE DE CD45+ FOI REALIZADO APÓS SEPARAR AS CÉLULAS VIVAS POR DAPI.....	26
FIGURA 9. SUBTIPOS DE MΦS APÓS LIEF. FIGURA 10A; DEMONSTRA OS GATES DAS CÉLULAS LY6C+ E LY6-, 9B MATRIZ DE CORRELAÇÃO, 9C E9D RESPECTIVAMENTE A FREQUÊNCIA DE LY6C+ E LY6- NO MÚSCULO TB.	27
FIGURA 10. CITOCINAS MUSCULARES APÓS LIEF. CONCENTRAÇÃO MUSCULAR DE MCP-1 (A) E TNF-Α (B), EXPRESSA EM PG/ML.....	28
FIGURA 11. CITOCINAS MUSCULARES APÓS LIEF. CONCENTRAÇÃO MUSCULAR DE IL-4 E IL-13, EXPRESSA EM PG/ML.....	28
FIGURA 12. CITOCINAS MUSCULARES APÓS LIEF.	29
FIGURA 13. WESTERN DO MÚSCULO TB APÓS LIEF. EXPRESSÃO DE AMPK-Α (FIGURA 13A)E PP65 (FIGURA 13B).	30
FIGURA 14. WESTERN DO MÚSCULO TB APÓS LIEF. EXPRESSÃO DE P65 TOTAL (FIGURA 14A) E GR (FIGURA 14B)	30
FIGURA 15. WESTERN DO MÚSCULO TB APÓS LIEF. ACHRA7 (FIGURA 15E) E A MATRIZ DE CORRELAÇÃO ENTRE GR E AMPK-Α (FIGURA 15F).....	31
FIGURA 16. O EFEITO DOS MEDICAMENTOS ANTI-INFLAMATÓRIOS SOBRE OS PROCESSOS DE REGENERAÇÃO MUSCULAR APÓS AS LESÕES MUSCULARES AGUDAS E APÓS AS LIEFS..	33
FIGURA 17. HIPÓTESE DOS EVENTOS OBSERVADOS. SEQUÊNCIA DE EVENTOS APÓS O PROTOCOLO DOWNHILL DE EXERCÍCIO FÍSICO NO MÚSCULO TRÍCEPS BRAQUIAL DE CAMUNDONGOS.	35
FIGURA 18. DIFERENÇA ENTRE A AÇÃO DOS SUBTIPOS DE MΦS APÓS LESÕES SEVERAS E LESÃO INDUZIDA PELO PROTOCOLO DOWNHILL.....	53

ABSTRACT

After skeletal muscle damage, the communication between inflammatory macrophages (M ϕ s), myogenic cells by cytokines secretion are essential for re-establishment of skeletal muscle structure. Although, these communications are poorly exploring after exercise induce muscle damage (EIMD). The aim of this study is to quantify M ϕ subtypes within mice muscles after *downhill* exercise protocol. Methods: Mice were exposed to an intermittent protocol of *downhill* exercise (18 bouts of running, each bout was consisted by 5 minutes with 2 minutes of rest interval. The treadmill inclination was set at -16°) and euthanized before (CTRL), one (D1), two (D2) and three (D3) days after exercise. After euthanasia, the Triceps brachial (TB), gastrocnemius (GAST), quadriceps (QUAD) and Tibialis anterior (TA) were collected, and submitted to protein extraction, immunostaining procedures or flow cytometry analysis. The anti-F4/80+ positive cells were utilized to determine accumulation of M ϕ into muscles and the CD45, CD64 and Ly6C antibodies were used to quantify M ϕ subsets in TB. Additionally, multiplex analysis was use for muscle cytokines quantification. Results: We did not observe any statistical differences on F4/80+ positive cells among muscles analyzed. By flow cytometry analysis, we observed an increase of CD45+ ($P < 0.05$) cells at day 3, with similar increase of Ly6C+ M ϕ s ($P < 0.05$), but the Ly6C- M ϕ s trended to a slight decrease ($P = 0.07$). We also noticed an elevation of the pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , MCP-1 and IFN- γ all with $P < 0.05$) along with an inverse correlation ($P < 0.05$ e C.C=-0.81) between Ly6C+ and Ly6C- M ϕ s, which suggest that this inflammation resulted M ϕ subset change on TB muscles 3 days after *downhill* exercise. Nevertheless, we also observed an increase we also observed a decrease trend of IL-4 ($P = 0.07$) and a significant increase of IL-13 ($P < 0.05$).Collectively, ours results indicates that *downhill* exercise induces an inflammation which were associate with M ϕ s subset change. Moreover, the secretion of some cytokines also indicates that these molecules might have an important role on myogenesis process after EIMD.

RESUMO

Após lesões musculares severas, a comunicação entre os macrófagos (Mφs) e células miogênicas é essencial para induzir o reestabelecimento das estruturas que compõem o músculo esquelético. No entanto, a comunicação e contribuição dos Mφs após lesão induzida pelo exercício físico (LIEF) ainda é pouco compreendida. O objetivo deste estudo foi avaliar a participação de dois subtipos de Mφs no músculo esquelético após LIEF. Os camundongos foram expostos ao protocolo de exercício em *downhill* (18 tiros de corrida, cada tiro composto de 5 min por 2 min de recuperação passiva, a inclinação da descida foi fixada a -16°). A eutanásia ocorreu imediatamente, 24, 48 e 72 horas pós-exercício (CTRL, D1, D2 e D3 respectivamente). O músculo tríceps braquial (TB), gastrocnêmio (GAST), quadríceps (QUAD) e tibial anterior (TA) foram dissecados e submetidos a extração proteica, montagem histológica ou digeridos para as análises de citometria de fluxo. A marcação por anticorpo F4/80 foi utilizada para quantificar Mφs nos músculos. Os anticorpos CD45, CD64 e *Ly6C* foram utilizados para determinar os diferentes subtipos de Mφs. Ainda, foi realizada análise por multiplex e *western blot* para a quantificação da expressão proteica e de algumas citocinas. Não foram observadas diferenças estatísticas na quantidade de células positivas para F4/80 entre os músculos analisados. No entanto, por meio de citometria, observamos aumento de células positivas para CD45 ($p < 0,05$), e de *Ly6C*⁺ ($p < 0,05$) três dias após o exercício. Neste mesmo momento também observamos tendência de redução de *Ly6C*⁻ ($p = 0,07$), aumento na concentração de citocinas pró inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , MCP-1 e IFN- γ , todas com $p < 0,05$) e correlação inversa com os entre *Ly6C*⁻ e *Ly6C*⁺ ($p < 0,05$ e C.C = 0,81). Por fim, também foi observado uma tendência na diminuição de IL-4 ($p = 0,07$) simultaneamente ao aumento de IL-13). Coletivamente, nossos resultados sugerem que o protocolo *downhill* foi responsável por induzir uma inflamação e que esta inflamação foi responsável por recrutar e modular os fenótipos de Mφs no músculo TB. Ainda, a secreção de algumas citocinas como a TNF- α e a IL-13 possivelmente podem estar associadas com os processos de miogênese após o protocolo de LIEF.

INTRODUÇÃO

A prática de exercícios físicos é responsável por modular diversas adaptações no organismo de seus praticantes. Essas adaptações, podem ser locais ou sistêmicas e capazes de promover melhorias na aptidão física como no aumento de força, equilíbrio, flexibilidade dentre outras. A prática contínua do exercício físico se associa positivamente com a manutenção da homeostase do organismo, refletindo diretamente na prevenção e tratamento de diversas doenças. No entanto, tanto as adaptações fisiológicas como as mudanças no quadro metabólico dos indivíduos podem ser minimizadas se o exercício não for praticado de forma adequada respeitando os períodos necessários para o reestabelecimento físico (Goh et al., 2012; Paulsen et al., 2012).

Um dos principais tópicos na fisiologia do exercício e do treinamento esportivo é relacionado com os processos de lesão e regeneração muscular (Paulsen et al., 2010a; Paulsen et al., 2010b; Paulsen et al., 2012). Esse fenômeno é comum na realização de diversas modalidades esportivas e necessário para que ocorra o reparo tecidual e adaptação muscular ao exercício. Graças à relevância fisiológica, as lesões induzidas pelo exercício físico podem ser resultantes de consequências intencionais, como nos treinamentos resistidos no qual o objetivo final é a potencialização de mecanismos associados à hipertrofia muscular (Paulsen et al., 2010a; Paulsen et al., 2010b; Paulsen et al., 2012). Apesar de importante, o tema ainda é motivo de divergências na literatura, por isso, diversos estudos tentam evidenciar os mecanismos celulares envolvidos no processo de lesão-regeneração após lesão induzida pelo exercício físico, assim, este estudo tem como foco avançar no conhecimento a respeito da participação dos subtipos de macrófagos (Mφs) envolvidos no processo de lesão e regeneração induzido pelo exercício físico.

CAPÍTULO-I

1-REVISÃO DE LITERATURA

1.1-SISTEMA IMUNOLÓGICO, SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCÍTICO E HETEROGENEIDADE DE MΦS.

O Sistema imunológico (S.I), associado ao sistema tegumentar é um dos mais importantes sistemas de defesa do organismo. Originadas na medula óssea, células mieloides e linfoides são suas principais subdivisões, na qual são responsáveis pela maioria das funções de defesa contra patógenos, incluindo a resposta imunológica inata e adaptativa (Abdelsadik and Trad, 2011; Akira, 2009).

As respostas imunológicas são dinâmicas e ocorrem de acordo com as suas características. De modo didático, o sistema imune inato pode ser assim classificado devido a sua presença ocorrer desde o nascimento (passado de mãe para filho) e as suas respostas serem rápidas, devido a sua prévia produção de moléculas e substâncias que constituem a resposta imunológica humoral (Abdelsadik and Trad, 2011; Geissmann et al., 2003; Geissmann et al., 2010).

A despeito da divisão didática a ação perfeita do sistema imunológico exige sincronismo entre as diferentes respostas e ações celulares. Por isso, o sistema imunológico é um dos sistemas mais complexos, plásticos e heterogêneos do organismo, onde muitas das vezes algumas células podem conferir respostas mais amplas nos processos envolvidos descaracterizando-as do modelo clássico de defesa contra patógenos (Villalta et al., 2009; Villalta et al., 2011).

Esse é o caso dos MΦs, que, além de participar ativamente nos processos de imunidade celular, também estão envolvidos por diversas formas na resposta inflamatória (Gordon and Martinez, 2010; Gordon et al., 2014; Haldar and Murphy, 2014).

Assim, temos que no fígado os MΦs, são denominados como células de *Kupffer* e podem apresentar funções relativamente diferentes dos MΦs alveolares. Durante as etapas de desintoxicação hepática, as células de *Kupffer* participam ativamente nos processos de limpeza celular resultante das detoxificações, aumentando assim sua atividade fagocítica. Por outro lado, quando associados aos alvéolos, esta capacidade fagocítica, dá lugar ao aumento da citotoxicidade, papel fundamental na defesa contra

patógenos no trato respiratório (Gordon and Martinez, 2010; Gordon et al., 2014; Haldar and Murphy, 2014).

As mudanças de função e magnitude das ações dos Mφs também podem ser evidenciadas nos processos de lesão e regeneração muscular, que é o objeto principal de estudo dessa Tese. Nos momentos iniciais após lesões induzidas por agentes químicos ou físicos, os Mφs exibem elevada capacidade fagocítica (Chazaud et al., 2007; Chazaud et al., 2003; Mounier et al., 2013; Varga et al., 2016b). No entanto, com o passar do tempo e evolução dos processos regenerativos a ação fagocítica dá lugar à secreção de fatores de crescimento que auxiliam a regeneração do músculo esquelético (Zhang & Mosser *et al.*, 2008 & Martinez *et al.*, 2010).

Contudo, por exibir esta complexa mudança de comportamento e potencial capacidade plástica, os Mφs despertaram grande atenção na área da imunologia nos últimos 30 anos, onde foi demonstrado de forma mais clara as diferentes funções deste tipo celular, subclassificando-os como Mφs associados a tumores (ATM), M1 e M2, que por sua vez também podem ser subdivididos em M2a, M2b e M2c (Gordon, 2003; Gordon and Martinez, 2010; Gordon et al., 2014; Mantovani et al., 2003; Mantovani et al., 2004; Mantovani et al., 2002).

Em alguns casos a ciência lançou mão de exemplos artísticos para exemplificar as diferentes funções dos Mφs. Este é o caso da revisão clássica publicada pelo grupo do professor Prof. Laskin em 2009, cujo o número de citações ultrapassa 200 nas principais bases de dados consultadas, como no Google acadêmico, SCOPUS e Web Science.

Neste estudo de Laskin e cols. (2009), os autores comparam a capacidade plástica dos Mφs com o filme “Guerra nas estrelas” feito nos anos 1970 pelo escritor e diretor George Lucas. No artigo, subintitulado “*Battle of forces*” os autores discutem que este tipo celular não só exibe um perfil heterogêneo e multifacetado, mas que seu comportamento também pode ser influenciado por diferentes estímulos, ou “forças”, como é citado no estudo, dadas as influências do microambiente. Por fim, o autor lembra que no filme, o mesmo ocorre com o protagonista “Anakin Skywalker” que, estimulado por “forças” distintas, assume papel de herói (Anakin) ou vilão (Darth Vader) (Laskin, 2009). Ainda contextualizando os Mφs por meio da arte o mesmo autor relaciona as funções dos distintos fenótipos de Mφs ao filme “*Jekyll and Hyde*” dirigido por Victor Fleming em 1941).

Segundo o autor em processos inflamatórios, células M1 podem agir como “monstro” exacerbando a inflamação, ao contrário das M2 que agem como “médico”, promovendo o desfecho da resposta inflamatória e restabelecimento a homeostase (Laskin, 2009). Curiosamente a utilização da “sétima arte”, considerada uma arte total, ilustra, de forma clara, como as células podem exercer diferentes funções dependendo do tecido e da necessidade. Todavia, hoje sabemos que seria ingênuo acreditar que uma célula como os Mφs, que podem ser classificadas em vários sub-tipos, exerce somente duas funções simplesmente delimitadas.

Diversos estudos têm demonstrado que a mudança no microambiente é determinante para o controle da mudança fenotípica dos Mφs, regulando desde a expressão de seus receptores como também as funções celulares que caracterizam este tipo celular (Mantovani *et al.*, 2004; Varin *et al.*, 2010; Gordon *et al.*, 2010). Os Mφs do tipo M1 são células que apresentam receptores *Toll like-1* e 4 e que podem ser estimulados por lipopolisacarídeos (LPS) e interferon- γ (IFN- γ). Dentre suas funções, quando ativados, estes Mφs são estimulados a produzir diversas substâncias como óxido nítrico (NO) e algumas citocinas pró-inflamatórias, como é o caso das IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

O aumento da produção de NO por Mφs M1 ativados também estimula a produção de diversos compostos tóxicos, como a produção de nitritos e espécies reativas de oxigênio (ERO), que auxiliam na atividade microbicida e amplificação das respostas pró-inflamatórias (Nikolaidis *et al.*, 2008; Villalta *et al.*, 2009).

Em contrapartida, quando o microambiente é composto por citocinas e/ou substâncias de caráter anti-inflamatório, especialmente IL-4, IL-13, IL-10, inibidor de proteases secretado por leucócitos (SLPI) e fator de crescimento tumoral beta (TGF- β), os Mφs são estimulados a responder de forma distinta, alterando seu fenótipo para um perfil conhecido como M2a, b ou c (dependendo da duração e natureza do estímulo) responsáveis por aumentar a produção de citocinas e fatores que dentre outras funções são responsáveis pela inibição dos Mφs do tipo M1 (Abdelsadik and Trad, 2011; Mantovani *et al.*, 2004; Umemura *et al.*, 2008).

Alguns autores foram categóricos ao elencar os estímulos que governam a ativação dos diferentes fenótipos da Mφs já que alguns estudos evidenciaram as diferentes respostas frente a ativação celular de diversas classes de citocinas, como as do tipo T auxiliares-1 (TH1) e do tipo T auxiliares-2 (TH2) (Gordon, 2003; Gordon

and Martinez, 2010). Quando estimulados por citocinas do tipo TH1 como IFN- γ , IL-2, IL-6 e TNF- α estes M ϕ s exibiam expressão dominante de alguns receptores específicos, dentre eles, a presença de CD11b, CD11c e F4/80, sendo estes dois últimos de considerável importância para as atividades pró-inflamatórias. No entanto, como demonstrado no quadro 1, quando estes M ϕ s são estimulados por glicocorticoides e citocinas do tipo TH2 tais como IL-4, IL-10 e IL-13, ocorre um aumento na expressão dos receptores CD163 e CD206 que promovem funções características da ativação M2 (Cho et al., 2014; Tidball and Villalta, 2010).

Portanto, fica evidente que a liberação de citocinas no microambiente de ativação é determinante para que se estabeleça as funções dos M ϕ s, tanto quanto para as suas mudanças fenotípicas. As vias que governam estas mudanças ainda são pouco compreendidas, principalmente após exercício físico (Lapointe et al., 2002; Minari et al., 2015; Minari et al., 2017; Tsivitse et al., 2003). Por outro lado, alguns estudos mostraram que estas mudanças de fenótipo podem estar relacionadas às mudanças metabólicas, principalmente àquelas relacionadas ao metabolismo de L-arginina, precursora da formação de NO (por meio da ativação enzimática de *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS)). Já quando os M ϕ s são estimulados por citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e IL-13 a L-arginina é convertida em arginase-1 aumentando a produção de prolinas e poliaminas, culminando no aumento da proliferação celular, secreção de TGF- γ e formação de colágeno (Briken and Mosser, 2011; Hesse et al., 2001)

Alguns estudos têm demonstrado importante predominância metabólica nos subtipos de M ϕ s envolvidos nos mais variados tipos de desafios imunológicos, como nos insultos infecciosos. Um bom exemplo, em particular são as vias metabólicas predominantes na ativação dos subtipos de M ϕ s, onde nos M1, ocorre a predominância do metabolismo glicolítico, contrastando com M2, onde sua preferência se dá pelo metabolismo oxidativo. Ainda, o succinato proveniente do ciclo de *Krebs* pode regular a expressão de *Hipoxia Induce Factor-1 alpha* (HIF-1 α), um dos principais reguladores da secreção de IL-1 β nos M1. Nos M2 o intermediário sedoheptulose quinase, fator semelhante ao carboidrato, é crítico na regulação das vias das pentoses, fator fundamental na regulação da atividade destes M ϕ s (Galvan-Pena and O'Neill, 2014).

Atualmente vários estudos têm evidenciado o comportamento dos subtipos de Mφs em diversos sítios de doenças, dentre elas, algumas doenças associadas ao músculo esquelético como a distrofia muscular de *duchenne*, fibroses e miopatias induzidas por sarcoidose (Villalta et al., 2011; Wehling et al., 2001). No entanto, ainda existe a necessidade de se melhor caracterizar os diferentes fenótipos de Mφs, bem como estabelecer como e o momento adequado para se incentivar ou inibir as suas diferenciações (An et al., 2017; Deng et al., 2012; Prokopchuk et al., 2007; Tidball and Wehling-Henricks, 2007; Wehling et al., 2001).

No quadro 1 está demonstrado alguns estímulos que motivam a ativação dos diferentes fenótipos de Mφs, bem como, os seus subtipos clássicos e as respostas esperadas em experimentos de cultura celular.

Quadro 1. Influência do microambiente na ativação dos diferentes tipos de Mφs.

Estímulos/receptores	Ativação de Mφs	Resposta
IFN-γ/LPS TLRS <i>Lipoproteínas bacterianas</i> TLRs <i>Dna de bactérias</i> TLRS <i>Proteínas e carboidratos de parasitas</i> FcR, <i>Partículas</i> <i>opsonizadas</i> Hipóxia Matriz anormal	M1	↑ Citocinas pró-inflamatórias; ↑ iNOS; ↑ EROS; ↑ atividade microbicida; ↑ MHC II; ↑ da apresentação de antígenos; ↑ lesão tecidual.
IL-4 IL-10 IL-13 TGF-β Glicocorticoides ↑ IL-10 ↑ TGF- β	M2 (a e b) M2 (c)	↑ endocitose ↑ expressão MR ↑ dectina-1 e arginase ↑ crescimento celular ↑ antiparasitária ↑ reparo tecidual ↑ IL-10 ↑ TGF- β ↑ PGE ₂

TLRs (Toll Like Receptor), IL- (interleucina), MR (receptor de manose) PGE2 (prostaglandinas-2) MHC (complexo maior de imunohistocompatibilidade) FcR (Fragment, crystallizable receptor). IFN- γ (interferon gama) TGF (fator de crescimento tumoral) EROS (espécies reativas de oxigênio).

1.2- PROCESSOS DE LESÃO E REGENERAÇÃO MUSCULAR

Lesões musculares ocorrem de forma corriqueira, pois o músculo esquelético é o principal tecido responsável pela locomoção dos indivíduos e também responsável por exibir funções que conferem proteção aos órgãos internos e sustentação física. Ainda, as lesões na musculatura esquelética também podem ser resultantes de esforços repetitivos que são reproduzidos diariamente em atividades manufatureiras do cotidiano, mesmo que não sejam resultantes de atividades que requeiram grandes esforços (Tidball, 2017; Tidball and Villalta, 2010).

Apesar das lesões musculares serem resultado de diferentes insultos, suas etapas de regeneração muscular quando de forma aguda são bastante similares. Por isso, nas últimas décadas diversos foram os estudos que se propuseram a entender como os diferentes tipos celulares poderiam contribuir para os processos regenerativos (Bar-Shai and Reznick, 2006; Brigitte et al., 2010; Deng et al., 2012).

Contudo, uma das principais células evidenciadas nestes processos nos últimos anos são os Mφs (Chazaud et al., 2009; Mounier et al., 2013), que além de exibir importante papel inflamatório e de limpeza tecidual, também são incumbidos de interagir e estimular a proliferação e diferenciação de células miogênicas (Arnold et al., 2007; Tidball and Wehling-Henricks, 2007).

Em estudo clássico conduzido por Massimino e cols. (1997), os autores foram um dos primeiros a demonstrar em cultura o potencial exibido por Mφs sobre a proliferação de células satélites, onde o exsudato de Mφs peritoniais, marcados para CD163 de ratos foi responsável por estimular a formação de miotúbulos via aumento da expressão de MyoD (Massimino et al., 1997).

Resultados similares foram encontrados por Merly e cols. (1999) cujo estudo realizado também em cultura celular, demonstrou que os Mφs peritoneais promoveram três principais alterações nas células miogênicas: aumento na diferenciação, na frequência de células positivas para MIOGENINA e na expressão de isoformas de miosina. Assim, por meio destes achados os autores sugeriram que os Mφs além de estimular a proliferação de células satélites, também estavam associados com as secreção de moléculas capazes de aumentar a diferenciação dos mioblastos (Merly et al., 1999).

Esses primeiros estudos em *in vitro* foram seguidos por outros que deram início as caracterizações dos Mφs *in vivo* nos processos de lesão e regeneração muscular.

No entanto, os estudos sobre o comportamento de Mφs *in vivo* apresentavam diversas limitações devido as caracterizações disto tipo celular serem realizadas por métodos pouco precisos com apenas marcações singulares, ineficientes na diferenciação das populações celulares específicas (Dijkstra et al., 1985; McLennan, 1996).

Todavia, com o desenvolvimento de técnicas mais apuradas como a citometria de fluxo, o conhecimento sobre as diferentes populações de Mφs *in vivo* nas lesões musculares puderam ser melhor compreendidos. Outro importante advento, que ampliou o conhecimento sobre a participação dos Mφs *in vivo* foram as utilizações de animais geneticamente modificados, como os modelos KO (KO).

Em estudo com camundongos KO para receptor de fator quimiotático tipo 2 (CCR2), responsável pelo recrutamento de monócitos da corrente sanguínea para o músculo, Warren e cols. (2005), investigaram o envolvimento de Mφs 28 dias após modelo de lesão muscular induzida. Dois foram seus principais achados. O primeiro que os animais KO para CCR2 apresentaram um atraso significativo nos processos de regeneração com consequente redução no infiltrado de Mφs comparado aos animais selvagens. Outro achado foi que as células miogênicas apresentaram menor expressão de MIOGENINA, o que explica em partes a limitada diferenciação de mioblastos observada nos períodos de regeneração muscular (Warren et al., 2005).

Em estudo posterior, Tidball e cols. (2007), investigaram o comportamento de Mφs sobre diversos parâmetros da regeneração muscular e comunicação com as células satélites após lesão muscular induzida. O modelo de lesão empregado foi o de imobilização, que consiste em pendurar os animais pelas patas durante dez dias e repousá-los durante outros quatro dias. A participação dos Mφs desta vez foi caracterizada pela utilização de anti-F4/80 (Anticorpo inibidor de F4/80 nos Mφs de camundongos) (*unloading e reloading model*) (Thomason and Booth, 1990; Tidball and Wehling-Henricks, 2007).

Neste estudo, no segundo e quarto dia de *reloading*, dois distintos tratamentos foram realizados. Primeiro, os animais receberam doses de anticorpo contra a ação de células positivas para F4/80 (grupo experimental) e de doses similares de IgE (imunoglobulina E) para os animais do grupo controle. Após 2 dias de tratamento não houve diferença no recrutamento de Mφs *in vivo* entre os grupos analisados, no entanto, quatro dias após o grupo experimental, como esperado, apresentou menor

quantidade de Mφs comparado ao grupo controle o que ocasionou uma menor porcentagem de fibras musculares lesionadas.

Ainda neste mesmo estudo, também foi observado que os animais do grupo experimental demonstraram um atraso nos processos regenerativos, onde no mesmo período de recuperação foi observado um aumento do centro nucleação de células satélites comparado aos animais do grupo controle (Tidball and Wehling-Henricks, 2007).

No mesmo ano, Arnold e cols. (2007) demonstraram de forma mais aprofundada a participação de Mφs e sua comunicação com células satélites, sendo um dos primeiros estudos a demonstrar que os Mφs apresentam diferentes subtipos de ativação durante os processos de lesão e regeneração muscular. Por meio de injeção de notexina, foram avaliados dois subtipos de Mφs no músculo TA dos animais, os Mφs *Ly6C⁺* e Mφs *Ly6C⁻* ao longo de um período de dez dias. Além destas análises dos Mφs *in vivo*, este estudo também evidenciou as influências do produto destas células em cultura celular na presença células satélites.

Em relação os subtipos de Mφs *in vivo* nos processos de lesão e regeneração muscular, tem sido proposto que a distinta participação destes subtipos, que também são demonstrados de forma didática na Figura 1. Além de apresentarem em diferentes quantidades ao longo do tempo, os Mφs também possuem diferentes parâmetros de ativação celular, já que os Mφs do subtipo *Ly6C⁺* apresentam assinatura pró-inflamatória, pois são de sintetizar e secretar TNF-α e IL-1β, enquanto que o subtipo *Ly6C⁻* com potencial anti-inflamatório capaz de sintetizar IL-10 e expressar PPAR-γ (Arnold et al., 2007; Deng et al., 2012; Mounier et al., 2013; Tidball, 2017; Varga et al., 2016a; Villalta et al., 2011).

Também foi demonstrado que os Mφs do subtipo *Ly6C⁺* atingiram seu pico dois dias após lesão, enquanto que, os do subtipo *Ly6C⁻* se apresentaram em maiores quantidades em dias seguintes, entre o quarto e o décimo dia. Ainda, no quarto dia, ambos os subtipos de Mφs se encontravam elevados. Esse perfil demonstrou que a ativação destes subtipos não acontece de maneira totalmente distinta “Yin e Yang” mas que existe períodos de transição onde podemos observar a elevação de ambos os subtipos (Arnold et al., 2007; Deng et al., 2012; Mounier et al., 2013; Tidball, 2017; Varga et al., 2016a; Villalta et al., 2011).

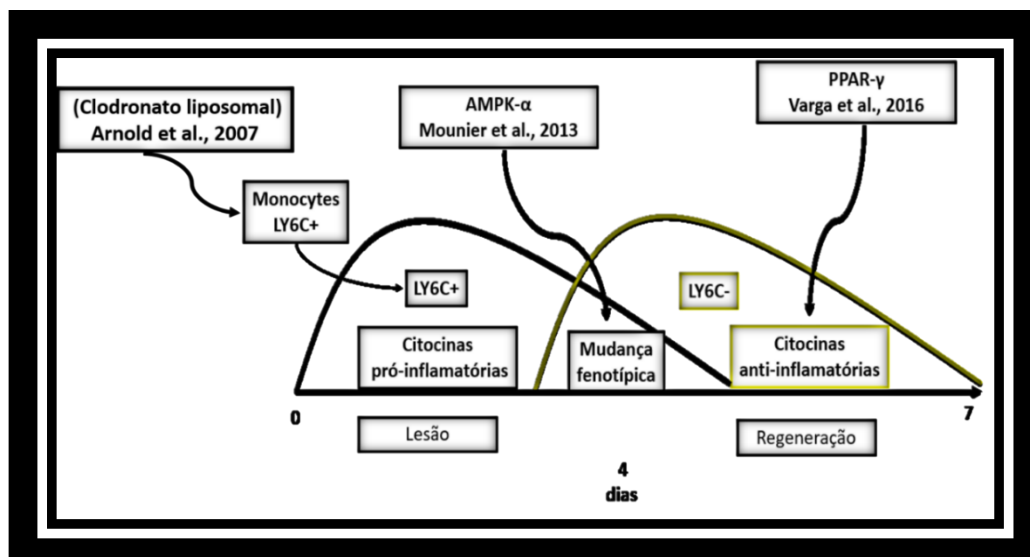


Figura 1. Envolvimento dos monócitos e Mφs após lesão muscular induzida. O processo de lesão e regeneração muscular são compostos de duas principais etapas, de lesão e regeneração muscular. A fase de lesão onde Mφs Ly6C+ são recrutados da corrente sanguínea para o músculo, amplificando os processos de lesão muscular por meio da secreção de citocinas pró-inflamatórias. E a fase de regeneração, onde os Mφs Ly6C+ mudam seu fenótipo em favor dos Mφs Ly6C-, promovendo a regeneração muscular por meio da secreção de substâncias anti-inflamatórias. Arnold et al., 2007 demonstrou que a inibição do recrutamento de monócitos Ly6C+ pela administração de CL causou inibição quase que completa dos processos de regeneração muscular após lesão muscular induzida por notexina. Mounier et al., 2013 demonstrou que a AMPK-α é fundamental para que ocorra a mudança fenotípica de Mφs e posteriormente Varga et al., 2016 com desenho experimental similar demonstrou que o PPAR-γ é fundamental para que o processo de regeneração possa ocorrer de forma adequada.

Ainda, no mesmo estudo de Arnold e cols. (2007), também foram realizados ensaios de co-cultura compostos de exsudado de Mφs previamente estimulados e de mioblastos, cujo qual foram avaliados parâmetros de crescimento, proliferação, diferenciação e fusão das células satélites. Nestes ensaios, os Mφs foram estimulados separadamente com IFN-γ e LPS (lipopolissacarídeos), IL-4 ou dexametasona e IL-10 e comparados ao ensaio controle (sem estímulo). Com este desenho experimental foi capaz demonstrar que a estimulação por IFN-γ/LPS promove o crescimento e a proliferação de células satélites que são etapas fundamentais para o início dos processos de regeneração muscular. Além disso, IL-4 também foi responsável por estimular as fases de crescimento e proliferação celular. No entanto, ao contrário da estimulação por IFN-γ/LPS, a ação de IL-4 e dexametasona associada ou não a IL-10, promoveu a diferenciação dos mioblastos, que é fundamental para o desfecho da inflamação e consequente regeneração muscular (Arnold et al., 2007).

Estes dois últimos trabalhos citados; de Tidball e cols. (2007) e Arnold e cols. (2007) foram pioneiros em caracterizar os diferentes subtipos de Mφs nos processos de lesão e regeneração muscular e suas possíveis implicações sobre a miogênese.

Ainda, estes estudos também demonstraram o importante papel de diferentes classes de citocinas controlando o processo de lesão e regeneração, quando as citocinas pró-inflamatórias agindo predominantemente nas fases de proliferação de células satélites e as citocinas anti-inflamatórias modulando os processos finais da miogênese.

Por ora, estava sedimentado o caminho para estudar os mecanismos de aprofundamento sobre o papel de algumas vias moleculares envolvidas com os processos de lesão e regeneração muscular no intuito de se determinar estratégias passíveis de intervenções nutricionais ou farmacológicas.

Neste sentido, Deng cols. (2012) utilizando camundongos *KO* para IL-10, observaram a influência da IL-10 durante os primeiros quatro dias após lesão muscular induzida por modelo de suspensão e estiramento do músculo sóleo. Nos animais selvagens, foi demonstrado aumento na expressão de TNF- α nas primeiras 24h e este aumento ocorreu de forma concomitante a ao pico de aumento de CD68. No entanto, no quarto dia ocorreu a diminuição de TNF- α e de CD68 simultaneamente ao aumento de IL-10 e de CD163. Em contrapartida, nos animais *KO*, o mesmo aumento de CD68 e de TNF- α foi observado nas primeiras 24h após a lesão, porém, no quarto dia, não foi observado aumento de CD163 apesar do aumento de IL-6 sugerindo que na ausência de IL-10, os M ϕ s ditos “pró-inflamatórios” sofreram inibição da sua mudança fenotípica para um perfil anti-inflamatório (Deng et al., 2012).

Todavia, em trabalhos mais recentes, do mesmo grupo do Prof. Ludovic Arnold, foram evidenciados o papel da AMPK-1 α (Mounier et al., 2013) e da PPAR- γ (Varga et al., 2016b) nos processos de regeneração muscular utilizando animais *KO* para as mesmas proteínas. Foi demonstrado em ambos os estudos que as ausências destas moléculas promoveram um importante atraso nos processos regenerativos nos músculos. Ainda, no modelo de AMPK-1 α (modelo *Lyz-Cre*) o atraso ocorreu devido os M ϕ s serem incapazes de mudar seu fenótipo do subtipo *Ly6C*⁺ em favor do fenótipo anti-inflamatório *Ly6C*⁻ (Mounier et al., 2013).

No modelo de animais *KO* para PPAR- γ (*Pparg*^{fl/fl} *Lyz2-cre*) também foi demonstrado um comprometimento nos processos de regeneração, similar aos achados em animais *KO* para AMPK-1 α (Mounier et al., 2013). No entanto, o mecanismo pelo qual o PPAR- γ limita os processos regenerativos estão associados com a secreção de GDF-3 (fator de crescimento diferencial 3), fator de crescimento secretado por M ϕ s do tipo *Ly6C*⁻ (Varga et al., 2016b). Contudo, na figura 2 é

demonstrado de forma didática um resumo das interações com os Mφs e o músculo esquelético com pontos de possíveis intervenções.

Apesar das evidências terem demonstrado a participação do PPAR- γ e da AMPK-1 α nos processos de regeneração muscular, existem outras moléculas que foram pouco exploradas como as moléculas relacionadas ao controle neuronal reflexivo (Fernandez et al., 2014). Alguns estudos veem demonstrando que a ativação destas moléculas, via seus receptores são importantes mecanismos locais de regulação inflamatória como na inibição da via de transição do NF κ B em Mφs inflamatórios (Leite et al., 2010; Saeed et al., 2005; Wang et al., 2016).

Entretanto, alguns outros estudos, ainda sugerem que a ativação de vias como a da STAT-3 (Matsukawa et al., 2007), SOCS (supressores de ativação de citocinas) (Strebovsky et al., 2012) e da síntese de NO e arginase (Deng & Tidball et al., 2012) nos Mφs também podem estar envolvidas com o controle inflamatório, visto que essas vias são fundamentais para a regulação de fatores anti-inflamatórios secretados por células inflamatórias.

Contudo, na figura 2 é demonstrado de maneira simplificada como ocorre a participação dos fenótipos de Mφs durante os processos de lesão muscular severa e os possíveis pontos de intervenção que podem ser inibidos por agente anti-inflamatórios, ou mesmo utilizando diferentes modelos de animais modificados para se excluir a ação destes subtipos.

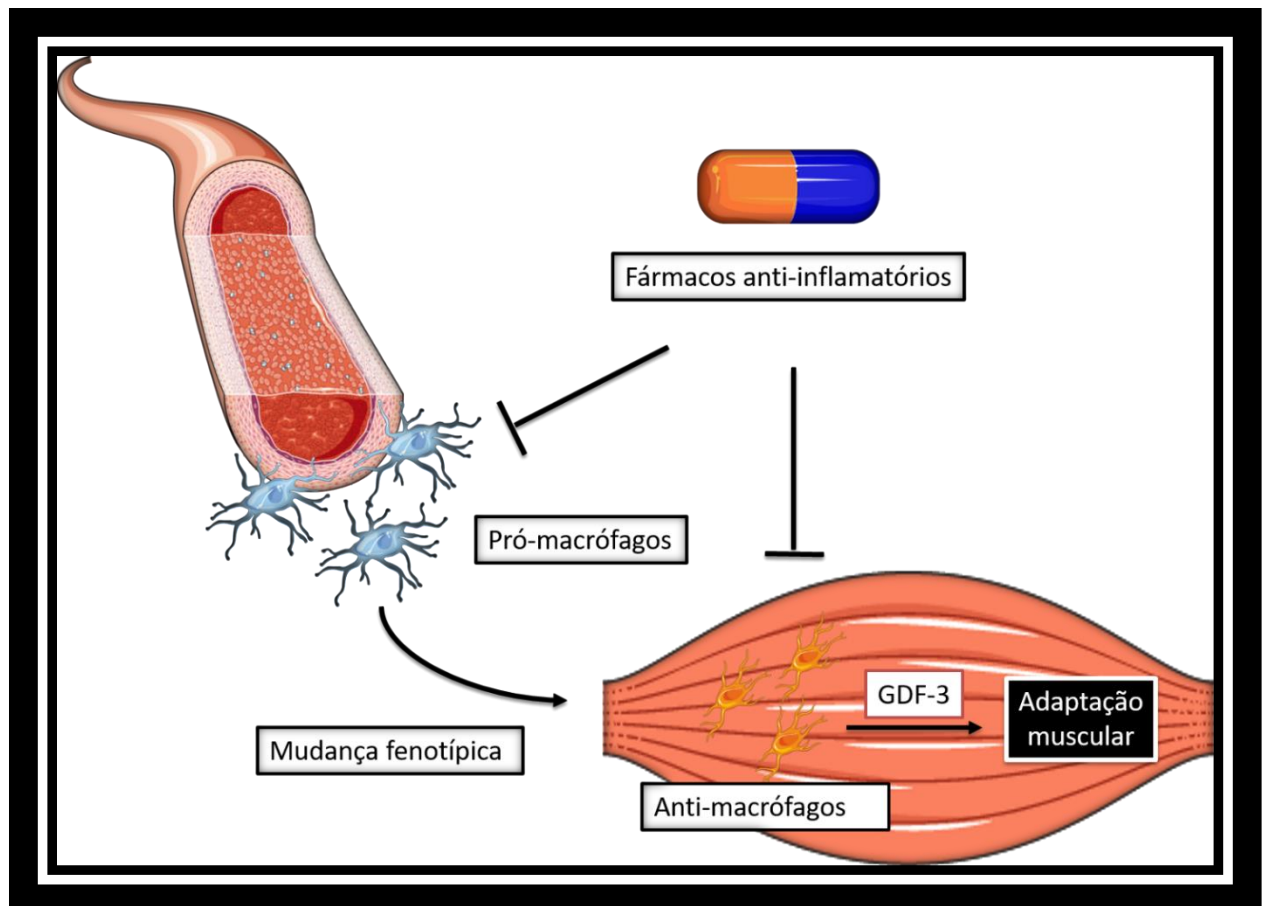


Figura 2. Intervenção anti-inflamatória nos processos de lesão e regeneração muscular. Após as lesões musculares severa os Pró-M ϕ s são recrutados da corrente sanguínea para o músculo para auxiliarem no processo de regeneração muscular. Durante este processo os Pró-M ϕ s mudam o seu fenótipo para os Anti-M ϕ s que são responsáveis por secretar GDF-3. Algumas intervenções farmacológicas como a administração de clodronato liposomal bem como bloqueadores da via do PPAR- γ inibem a participação de M ϕ s, respectivamente inibindo o recrutamento de M ϕ s ou a sua secreção de fatores de crescimento, culminando em um maior período de regeneração muscular.

1.3- LESÃO INDUZIDA PELO EXERCÍCIO FÍSICO (LIEF)

Apesar dos principais avanços sobre a participação dos diferentes fenótipos de Mφs sobre os processos de lesão e regeneração muscular terem sido evidenciados em lesões severas, pouco se sabe sobre o papel dos seus subtipos de Mφs envolvidos nas LIEFS e a sua contribuição para as adaptações musculares como no processo de hipertrofia. Na revisão de Paulsen e cols. (2012) foram demonstrados e sugeridos possíveis mecanismos regenerativos destes Mφs nas LIEFs, debatendo também como algumas estratégias farmacológicas podem comprometer os processos de recuperação e adaptação muscular durante o treinamento físico (Paulsen et al., 2012).

Em boa parte do estudo os autores definiram teoricamente o que eles consideram diferentes magnitude de lesão após a realização do exercício físico. Assim uma lesão pode ser classificada como baixa, moderada ou severa. As severas são as únicas que apresentam alterações estruturais bem definidas por análise histológica.

Em seres humanos o método mais utilizado para se determinar os processos de LIEF é o tempo necessário para indivíduo recuperar completamente a capacidade de geração de força após a lesão. Já em relação aos trabalhos com experimentação animal, o método mais utilizado para definir a magnitude das lesões é a histologia através da avaliação da evolução do processo de regeneração muscular (Paulsen et al., 2012).

Neste sentido, de acordo com Paulsen e cols. (2012) e Prof. Truls Raastad da escola norueguesa de ciências do esporte (dados não publicados, para maiores detalhes ver a revisão de Paulsen e col. 2012), em seres humanos uma lesão de baixa magnitude é aquela que os indivíduos são capazes de recuperar totalmente a capacidade de geração de força em até 48hs após a lesão. A lesão moderada é aquela quando os indivíduos demoram entre três e sete dias para ter recuperação total da força e uma lesão severa ocorre quando mais de sete dias são necessários para a recuperação total (Paulsen et al., 2012).

As magnitudes de lesão sempre estão acompanhadas do acúmulo de células inflamatórias nas fibras do músculo esquelético. Nas lesões de baixa magnitude ocorre redução de 20% da capacidade de geração de força com modesto recrutamento de leucócitos nas fibras musculares (Crameri et al., 2007; Paulsen et al., 2012).

Já nas lesões de magnitude moderada, (diminuição da capacidade de geração de força em torno de 20 a 50%), em cinco dos oito estudos analisados foi observado um acúmulo mais robusto de leucócitos (Beaton et al., 2002a; Beaton et al., 2002b; Hubal et al., 2008; Paulsen et al., 2010a; Paulsen et al., 2012). Porém em apenas um deles houve sinais de dano muscular (Paulsen et al., 2010a). Por fim, mais da metade dos estudos com lesão severa apresentaram aumento do número de leucócitos e sinais de necrose muscular (Child et al., 1999; Hellsten et al., 1997; Hikida et al., 1983; Jones et al., 1986; Lauritzen et al., 2009; Paulsen et al., 2010b; Round et al., 1987; Sherman et al., 1984) e somente um não identificou sinais de necrose (Hellsten et al., 1997).

Deste modo, é importante salientar que nos estudos das LIEFs, as identificações dos fatores relacionados com a diminuição da capacidade de geração de força são por vezes limitados, pois, alguns protocolos utilizando a realização de exercícios físicos intensos são responsáveis pela redução da capacidade de geração de força, no entanto sem apresentar sinais claros de alterações miofibrilares ou processos de necrose. Ainda, também é importante apontar que em humanos é comum os indivíduos apresentarem variabilidade nas respostas lesivas devido a adaptações musculares locais conquistadas previamente, inclusive reestruturação neural e motora, o que pode minimizar significativamente alterações estruturais e metabólicas ocasionadas pela mesma atividade.

Outros fatores também são responsáveis por influenciar a variabilidade das respostas lesivas após as LIEFs tais como os métodos de análise indiretos tendo em vista a dificuldade de realização de biopsia muscular em seres humanos. Assim, ao invés de mensurar a área afetada pela lesão muscular de forma direta, alguns marcadores enzimáticos oriundos da musculatura esquelética, são utilizados, como é o caso da ação enzimática da creatina quinase.

No entanto a mensuração da atividade da creatina quinase sofre algumas limitações. A primeira é que sua elevação na corrente sanguínea pode ser resultante do aumento da permeabilidade muscular e não do dano. Outra limitação é a individualidade em relação resposta do protocolo de lesão, o qual permite a classificação em indivíduos altamente responsivos (> 10,000 IU/L) ou reduzidamente responsivos (< 1,000 IU/L)(Jones et al., 1986; Manfredi et al., 1991; Paulsen et al., 2010a; Paulsen et al., 2012).

Em modelos animais especialmente em o estudo das LIEFs parece trazer alguns benefícios no sentido das análises histo-morfométricas da lesão muscular e melhor identificação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos. Por outro lado, apesar de termos uma melhor qualidade em análises da LIEF os resultados obtidos a partir de modelos animais apresentam limitações no sentido de evidenciar alterações musculares de maneira fisiológica, uma vez que os protocolos de LIEF em modelos animais se reduzem aos protocolos de exercício físico contínuos com subida ou com descida, que são sensivelmente diferentes dos protocolos de exercício físico resistido aplicados corriqueiramente em humanos (Paulsen et al., 2010a; Paulsen et al., 2012).

Diante de tantas limitações no que tange a literatura científica parece haver uma inconsistência nos resultados de estudos com seres humanos comparado com os resultados em estudos com animais no que diz respeito a duração do fenômeno, visto que em animais o processo de lesão e regeneração muscular parece ser finalizado em no máximo três dias) comparado a humanos que pode durar até sete dias apesar de as etapas histológicas se apresentarem de forma similar. Estas diferenças podem ser bastante debatidas no sentido de que os roedores utilizados nunca foram submetidos a qualquer desafio muscular prévio, sendo os protocolos de LIEF em humanos mais assertivos no isolamento do grupo muscular comparado aos protocolos clássicos em camundongos.

Em estudos com roedores um dos protocolos mais utilizados de LIEF são os de exercício físico excêntrico na modalidade *downhill*. Este tipo de exercício apesar de não conseguir induzir uma lesão extensa no músculo comparado a outros modelos de lesão severa, ainda é o modelo que mais se aproxima da realidade fisiológica imposta pelo exercício físico, uma vez que também estimula alterações metabólicas oriundas do desafio homeostático que o exercício representa. Conquanto, desde seu advento por Armstrong e cols. (1983), diversos foram os estudos que utilizaram este protocolo para poder entender como o músculo esquelético reage aos insultos provocados pelo exercício físico, principalmente no que diz respeito à indução de sinais de lesão e acúmulo de leucócitos no músculo esquelético. Na tabela 2 é demonstrado os estudos que evidenciaram as LIEFs e analisaram a presença ou ausência de sinais de necrose e o infiltrado de Mφs após o exercício físico agudo *downhill*

CAPÍTULO II

2-OBJETIVOS E HIPÓTESE

2.1- OBJETIVO GERAL:

Analisar o envolvimento dos subtipos de Mφs nos processos de lesão e regeneração muscular após protocolo de exercício físico agudo em *downhill*.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1 – Quantificar por imuno-histoquímica a quantidade de Mφs musculares por meio de marcação F4/80 após exercício físico em *downhill*.

2 – Quantificar os subtipos de Mφs Ly6C⁺ e Ly6C⁻ após o protocolo de dano induzida pelo exercício físico em *downhill*.

3 – Quantificar a expressão de proteínas e citocinas específicas relacionadas com o controle inflamatório e regeneração muscular após exercício físico em *downhill*.

2.3- HIPÓTESE:

Este estudo tem como hipótese que a LIEF é capaz de modular os diferentes subtipos de Mφs durante até três dias de recuperação e que as regulações destes subtipos celulares estão relacionadas como as vias moleculares da AMPK e do NFK-B e citocinas.

CAPÍTULO III

3-MÉTODOS

3.1 – MODELO DE ESTUDO:

O presente estudo é considerado quantitativo, cujos resultados foram avaliados em instantes pré e pós-intervenção. O trabalho é composto por grupos experimentais e grupo controle, submetidos à aleatoriedade, portanto é classificado como ensaio experimental controlado e randomizado.

3.2- ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para os experimentos no Brasil foram utilizados 30 camundongos machos, C57/BLACK com 8 semanas de idade (19 para os experimentos no *multiplex* e 11 animais para os experimentos de *Western Blot*). Todos os animais foram provenientes do biotério central da UNIFESP. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas contendo cinco animais e permaneceram no biotério do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP com em ciclo claro/escuro de 12 horas e início do período claro às 07h00 hs. A temperatura e umidade relativa do ar foram controladas em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ respectivamente e os animais tiveram água e ração *ad libitum*.

Antes do início das atividades o protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (número de registro #9151260314). Para os experimentos no laboratório INSERN do Instituto de Neuromyogenese da Universidade Claude Bernard 1 em Lyon, foram utilizados 28 camundongos machos com as mesmas características e mantidos nas mesmas condições do biotério do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP. A divisão dos animais obedeceu ao mesmo desenho experimental, no qual os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos: controle (CTRL) cujos animais não sofreram qualquer procedimento, dia 1 (D1) cujos animais foram exercitados e eutanasiados 24 horas após o final do exercício, dia 2 (D2) cujos animais foram exercitados e eutanasiados 48 horas após o final do exercício e dia três (D3) cujos animais foram exercitados e eutanasiados 72 horas após o final do exercício. Os experimentos também foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética e pesquisa francês autorizando o exercício físico e as análises por citometria de fluxo dos tecidos de 15 animais e histológicas de 13 animais.

Após um breve período de adaptação, os animais foram submetidos ao protocolo de exercício. Assim este estudo foi subdividido em três partes. A primeira parte consistia na adaptação dos animais à esteira e ao gesto motor da corrida. Na segunda parte os animais dos grupos exercitados realizaram o exercício e foram eutanasiados segundo o desenho experimental e a terceira parte composta pelas análises dos tecidos e células. O desenho experimental está demonstrado na figura 3.

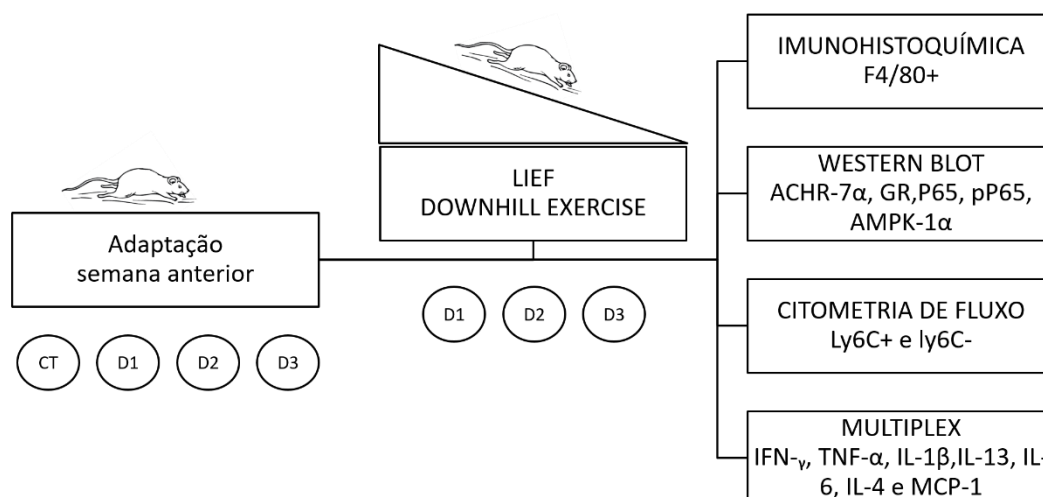


Figura 3. Desenho Experimental. Os experimentos foram divididos em três partes. Todos os camundongos foram submetidos ao protocolo de adaptação por três dias e separados aleatoriamente em grupo controle e grupos experimentais. Os animais do grupo controle realizaram todos os procedimentos com exceção do protocolo de exercício físico e foram eutanasiados simultaneamente com os animais dos grupos experimentais. Os animais dos grupos experimentais foram submetidos ao protocolo *downhill* e eutanasiados 24, 48 ou 72 horas após o exercício (D1, D2 e D3 respectivamente). Após eutanásia os tecidos e sangue foram coletados e tratados para a realização posterior dos ensaios experimentais de imuno-histoquímica, citometria de fluxo, multiplex e *western blot*.

3.3-PROTOCOLO DE LESÃO INDUZIDA PELO EXERCÍCIO FÍSICO (LIEF) E EUTANÁSIA

Os animais dos grupos experimentais foram submetidos ao protocolo de adaptação que consistiu em corrida contínua na velocidade de 10 m/min por 10 min sem elevação por três dias consecutivos durante a semana anterior ao exercício físico em *downhill*. Após adaptação os animais repousaram por dois dias e então foram submetidos ao protocolo de exercício físico *downhill* para gerar LIEF como padronizado em estudo prévio (Armstrong et al., 1983b). O protocolo *downhill* consistiu de 18 tiros de corrida com velocidade de 16 m/min e 16° negativos de inclinação durante 5 min. Entre cada tiro houve 2 min de recuperação passiva. O

tempo total da sessão de exercício foi de 90 min. Todos os grupos foram eutanasiados entre 9:00 e 12:00 hs, no primeiro, segundo e terceiro dias após o exercício físico *downhill*. Antes e depois do protocolo de LIEF os animais permaneceram em gaiolas coletivas com comida e água *ad libitum*. As eutanásias foram realizadas por meio de decapitação sem anestesia e os músculos quadríceps (QUAD), tibial anterior (TA), gastrocnêmico (GAST) e tríceps braquial (TB) foram dissecados, montados na cortiça e posteriormente submetidos aos procedimentos de imuno-histoquímica. O mesmo procedimento foi realizado para a extração de células vasculares estromais para a análise dos Mφs por citometria de fluxo. Os animais do grupo controle realizaram todos os procedimentos com exceção do protocolo de LIEF.

3.4- IMUNO-HISTOQUÍMICA

A porção distal de cada músculo foi orientada e montada em pedaços de cortiça, presa com uma goma adragante e imersa imediatamente em isopentano previamente resfriado. Após o congelamento os tecidos foram mantidos em isopor com gelo seco até seu direcionamento para o *freezer* -80°C. Os cortes com 10 mm de espessura foram obtidos de maneira seriada no criostato a -25°C. Para os procedimentos de marcação de F4/80, os cortes seriados foram colocados nas lâminas salinizadas e incubadas em paraformaldeído a 4%. Os anticorpos primários para F4/80 e Laminina (Abcam®, Cambridge, MA, USA) foram diluídos em uma solução de soro Fetal Bovino (SFB) 1%, transferidos para as lâminas e incubados. Após subseqüentes lavagens, os anticorpos secundários Alexa Fluor 555 Goat Anti-Rat IgG (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA) e Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA) também foram diluídos em tampão fosfato salina (PBS), adicionados e incubados nas lâminas. Os anticorpos foram diluídos nas seguintes proporções: F4/80 (1:400 v/v), Laminina (1:400 v/v), Alexa Fluor 555 Goat AntiRat IgG (1:200 v/v) e Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (1:200 v/v). As fluorescências foram analisadas e gravadas com o *software* associado ao microscópio Zeiss Axio Observer Z1®, microscópio conectado com a câmera *Coolsnap* apresentando magnitude de aumento em 20x. Dez fotos de campos aleatórios foram fotografadas e as células positivas para F4/80 contadas a partir do julgamento do próprio observador. Na figura 4 está demonstrado um exemplo de imagem considerando uma célula positiva para F4/80.

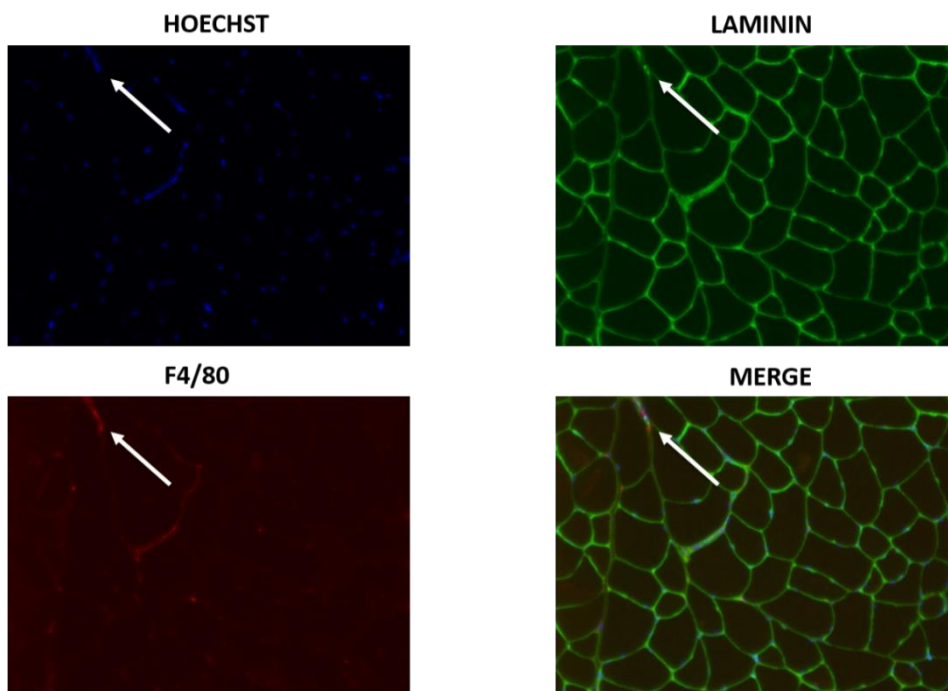


Figura 4. Imuno-histoquímica das células positivas para F4/80. Núcleo (Hoechst/DAPI) marcado em azul, Laminina (lamina basal) marcada em verde e células positivas para F4/80 marcadas em vermelho. As figuras foram sobrepostas e a quantificação realizada pelo observador. Bar 50µm.

3.5-ISOLAMENTO DE MARCAÇÃO DOS MΦS MUSCULARES

As fâscias dos tecidos musculares foram removidas e os músculos TB de ambas as patas traseiras foram dissociadas uma vez em solução contendo meio RPMI e collagenase B 0,2% (Roche Diagnostics GmbH®) (1 ml de solução para cada 100 g de tecido muscular) a 37°C por 60 min. Após a digestão as células foram filtradas e contadas em câmara de Neubauer utilizando *trypan blue*. Após procedimento de contagem e viabilidade celular as células foram marcadas com anticorpos anti-CD45 anti-*Ly6C*, anti-CD64; anti-CD206 e anti-F4/80 (eBioscience® San Diego, US). As análises foram realizadas utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto II® (BD Biosciences®, San Jose, US) e analisado através do Diva software®. A estratégia de marcação para os subtipos de Mφs foram as células CD45⁺CD64⁺*Ly6C*⁺ e CD45⁺CD64⁺*Ly6C*⁻, como demonstrado na figura 5 e para Mφs totais CD45⁺CD206⁺F4/80⁺ demonstrado na figura 6.

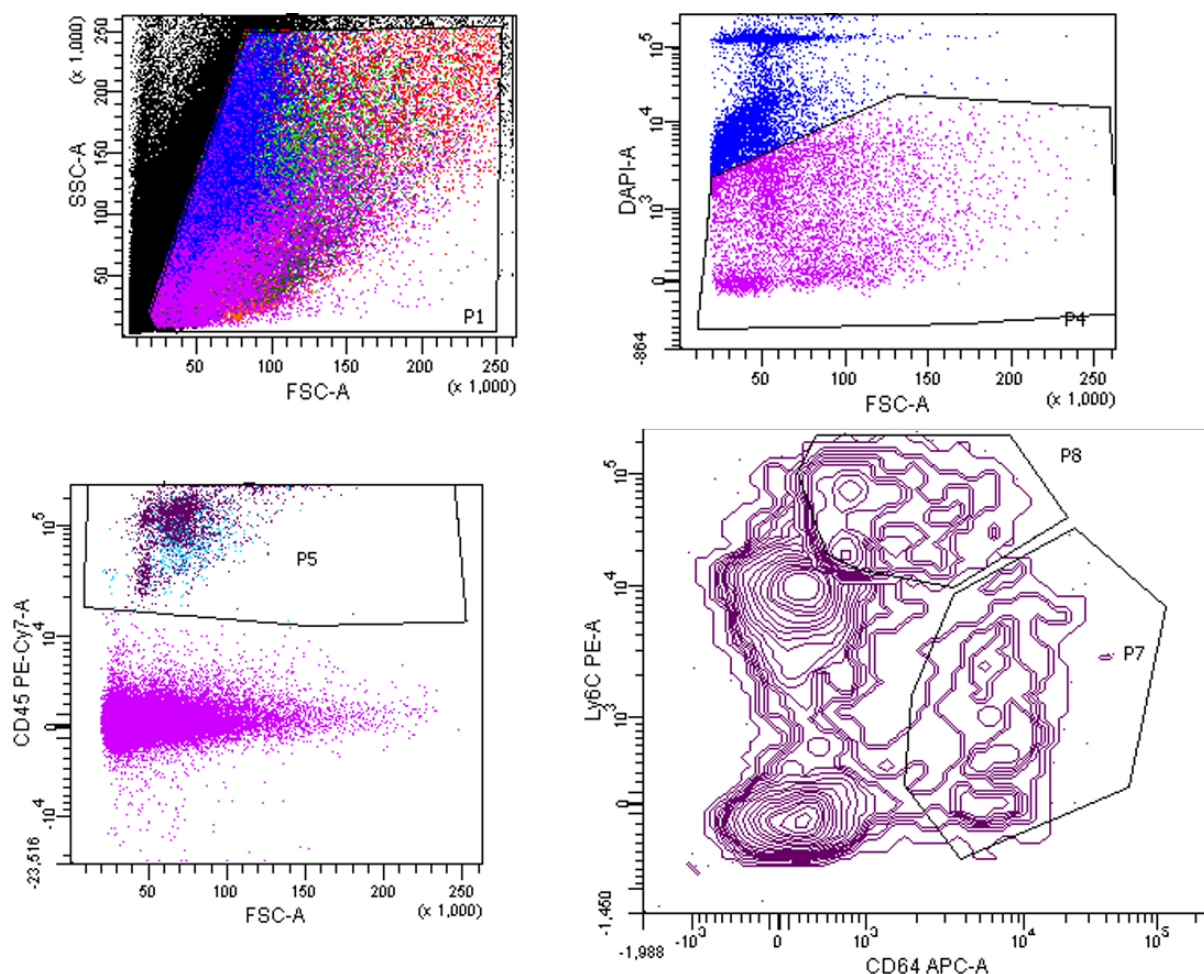


Figura 5. Estratégia de Gating para as subpopulações de Mφs Ly6C⁺ and Ly6C⁻ no TB três dias após o protocolo *downhill*. As células foram selecionadas por seu tamanho (forward scatter) e granulidade (side scatter) e respectivamente submetida a seleção de células vivas (DAPI); CD45⁺ e CD45⁺CD64⁺Ly6C⁺ ou CD45⁺CD64⁺Ly6C⁻.

3.6-MULTIPLEX

Os tecidos musculares tiveram suas proteínas extraídas por meio de 1,0 ml de tampão específico para extratos totais, composto por Trizma base (pH=7.5), 10 mM EDTA, 10% SDS, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de pirofosfato de sódio, 10 mM de ortovanadato de sódio. O tampão foi preparado no dia do experimento. Os tecidos rapidamente homogeneizados e centrifugados por 40 min. a 12000 rcf a 4°C. Assim foram dosadas as quantidades de MCP-1, IL-4, IL-13, IL-6, IL-1β, IFN-γ e TNF-α do extrato muscular utilizando os kits MILLIPLEX MAP *Multiplex Assay*, de acordo com as instruções do fabricante (Millipore®, Darmstadt, Germany)

3.7-EXPRESSÃO PROTEICA (WESTERN BLOT).

Após a extração de proteínas o sobrenadante mantido em gelo e o teor de proteínas totais determinado por Bradford et al. (1976) utilizando kit comercial da BioRad® (Hercules, CA, USA). As amostras foram adicionadas na proporção volumétrica de 4:1, o tampão de *Laemmli* composto de 0,01% de azul de bromofenol, 50 mM fosfato de sódio, 25% de glicerol e 1% SDS contendo 200 mM DTT. Foram consideradas 150 µg de proteínas para a análise de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 10%. Após a separação eletroforética, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 2 horas em temperatura ambiente (ou *overnight* 4°C dependendo das especificações de cada anticorpo), bloqueadas por 2 horas em 15 ml de solução bloqueadora, (10 mM de Trizma base, 150 mM de NaCl, e 50 µl/ml de Tween) contendo 1% BSA. Em seguida, foi feita a incubação com o anticorpo primário específico por 2 horas em temperatura ambiente, com o anticorpo dissolvido em solução basal e BSA 1%. A membrana foi incubada por uma hora com anticorpo secundário associado à peroxidase. O anticorpo secundário consistiu em uma anti-imunoglobulina dirigida contra o animal produtor de anticorpo primário.

Após três lavagens com solução bloqueadora, a membrana foi revelada por quimiluminescência mediante reagente de revelação (Danvers, MA, USA). Na sequência a membrana foi exposta a filme de raios-X. As bandas de interesse foram identificadas pelo seu padrão de migração eletroforética, por comparação de padrões conhecidos e quantificadas por densitometria utilizando-se o programa Scion Image® (Frederick, Md., USA). As proteínas analisadas foram AMPK-1α, P65 total, pP65, ACHRα7 e GR.

3.8-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de Levene para avaliar a homogeneidade das amostras. Quando os dados não eram homogêneos foram padronizados em log na base 10. Para identificar diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizada uma ANOVA de uma ou duas vias com *post-hoc Games Howell*. Para a análise por *western blot* comparamos o grupo CTRL versus o terceiro dia utilizando teste T não pareado. Quando necessário foi verificado o tamanho do efeito por teste *D de Cohen*, considerando $F \leq 0,2$ tamanho de efeito fraco, $F \leq 0,5$ médio e $F \leq 8$ forte. Para o coeficiente de correlação, utilizamos o teste de duas saídas de

Spearman. Nas figuras os resultados são expressos em média e desvio padrão (D.P) para as imuno-histoquímicas e *western blot* (figura 6, 13, 14, 15) e em média mínimo e máximo para a citometria de fluxo e *multiplex* (figura 7 até 12). A diferença estatística foi fixada em $p \leq 0,05$ e o *software* utilizado para as análises foi o IBM SPSS *Statistics* version 23®.

CAPÍTULO IV

4.0-RESULTADOS

A contagem de células positivas para F4/80 nos quatro músculos dissecados dos camundongos está demonstrada na figura 6. Não observamos diferenças estatísticas entre os músculos analisados. Contudo, comparando com seu grupo CTRL o músculo TA apresentou quantidade maior de células F4/80 positivas no segundo e terceiro dia após o protocolo *downhill* ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu no músculo QUAD no segundo dia ($p < 0,05$).

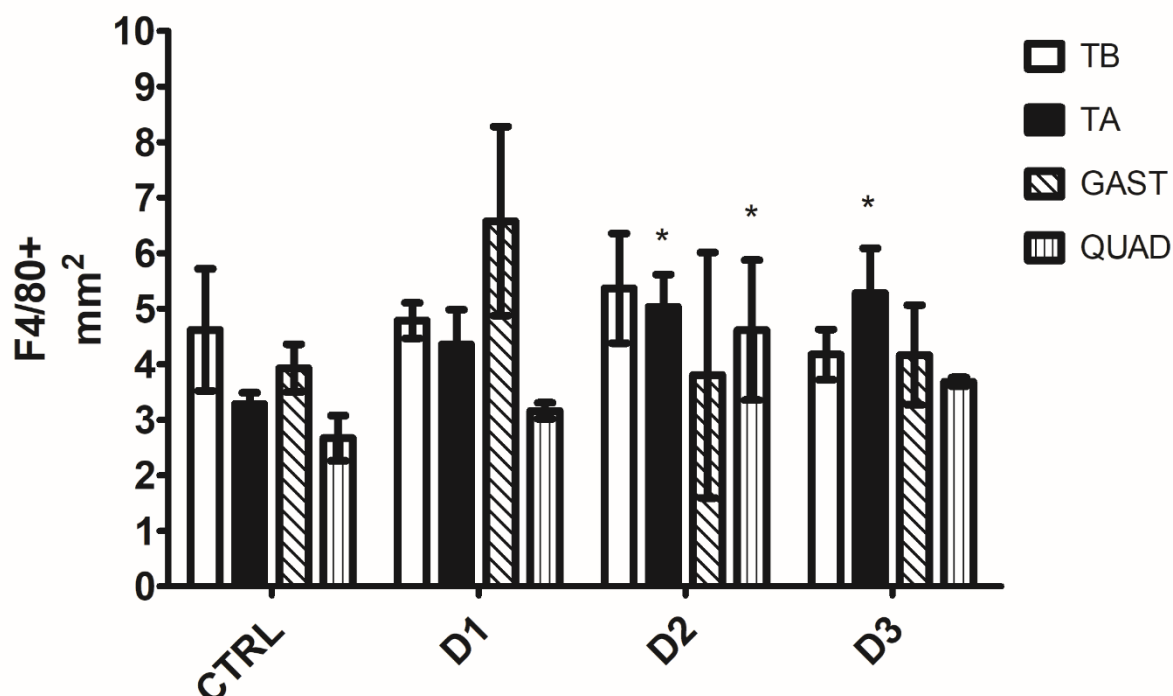


Figura 6. Células F4/80 positivas. Os resultados estão expressos em quantidade de células por mm² de tecido e demonstrados em média e DP. (*) diferente em relação ao seu respectivo controle. CTRL, n=3; D1, n=4; D2 n=4; e D3, n=4. Análise estatística ANOVA de duas vias foi realizada seguido pelo post-hoc de Games Howell, ($P < 0,05$). (TB=tríceps; TA=tibial anterior; GAST=gastrocnêmio; QUA=quadríceps).

Na figura 7, está demonstrada a frequência de células $CD45^+F4/80^+CD206^+$. Não foram observadas diferenças em relação aos Mφs totais nos músculos TB.

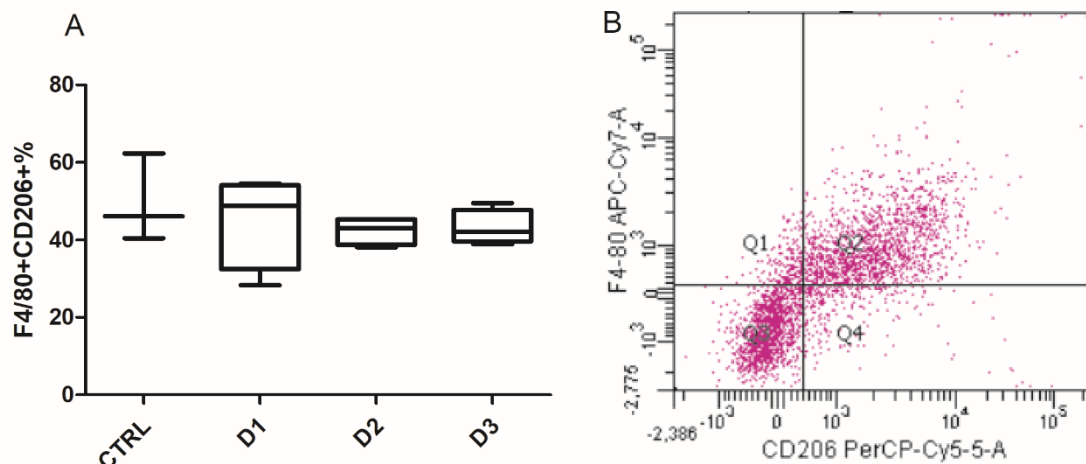


Figura 7. Frequência de Mφs totais no músculo TB. O gate de células $CD206^+F4/80^+$ foi realizado a partir do gate de células $CD45^+$. Os resultados são expressos em % e demonstrados em média min/máx pela frequência de células $CD45^+$. CTRL, n=3; D1, n=4; D2, n=4 e D3, n=4. ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Games Howell.

Em relação à estratégia de *gating* utilizada para a marcação dos subtipos de Mφs, primeiro foi determinado o número de células vivas por meio da marcação por DAPI. Subsequentemente marcamos as células positivas para CD45 e por fim as populações celulares que expressaram marcadores dos subtipos de Mφs CD64⁺Ly6C⁺ e CD64⁺Ly6C⁻. Deste modo, a figura 8 demonstra que o exercício físico agudo *downhill* aumentou a frequência de CD45⁺ no terceiro dia comparado ao seu respectivo controle ($p < 0,05$).

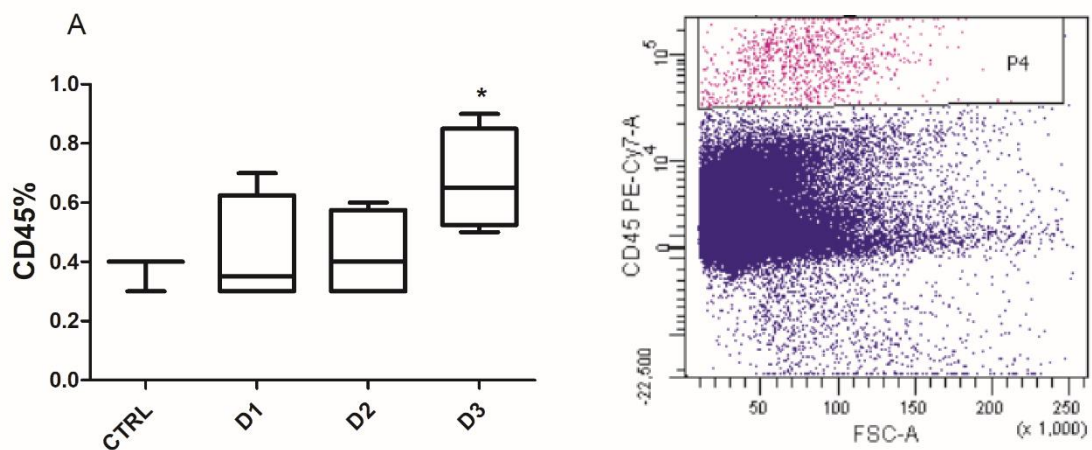


Figura 8. Total de células CD45+ no músculo TB. O gate de CD45+ foi realizado após separar as células vivas por DAPI. Resultados expressos em % e demonstrados em média, min/máx. pela frequência de células vivas. (*) diferente em relação ao controle CTRL, n=3; D1, n=4; D2, n=4 e D3, n=4. ANOVA de uma via foi seguida por post-hoc de Games Howell, $P < 0,05$

Houve também, aumento do número de células $Ly6C^+$ ($p < 0,05$) e uma tendência de diminuição das células $Ly6C^-$ ($p = 0,07$) com forte tamanho de efeito ($F = 1,55$) no terceiro dia comparado ao seu respectivo grupo CTRL. Ainda, uma correlação inversa foi observada entre as células $Ly6C^+$ e $Ly6C^-$ ($r = -0,8$; $p < 0,05$) como demonstrado na figura 9 A e B.

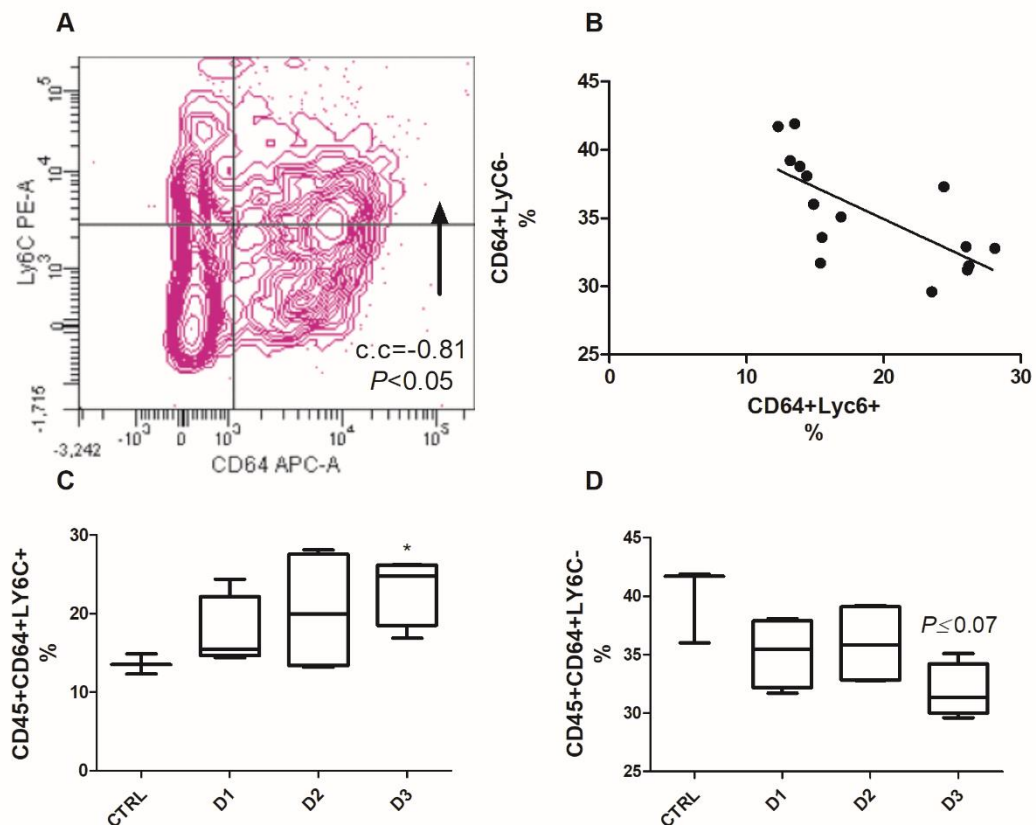


Figura 9. Subtipos de Mφs após LIEF. Figura 10A; demonstra os gates das células Ly6C⁺ e Ly6C⁻, 9B matriz de correlação, 9C e 9D respectivamente a frequência de Ly6C⁺ e Ly6C⁻ no músculo TB. (*) diferente em relação ao controle. A seta na figura 9A indica a direção do coeficiente de correlação de Spearman. Na figura 9D a tendência de decréscimo do subtipo Ly6C⁻ no D3. CTRL, n=3; D1, n=4; D2, n=4 e D3, n=4. ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Games Howell e correlação de Spearman foi utilizada, $p < 0,05$.

Por *multiplex*, nós também analisamos as concentrações de citocinas envolvidas com os processos de lesão e regeneração muscular após LIEF no músculo TB. A Figura 10A demonstra que a concentração muscular de MCP-1 foi maior no terceiro dia comparado a todos os outros momentos ($p < 0,05$). O mesmo resultado também foi observado em relação às concentrações de TNF- α (figura 10B).

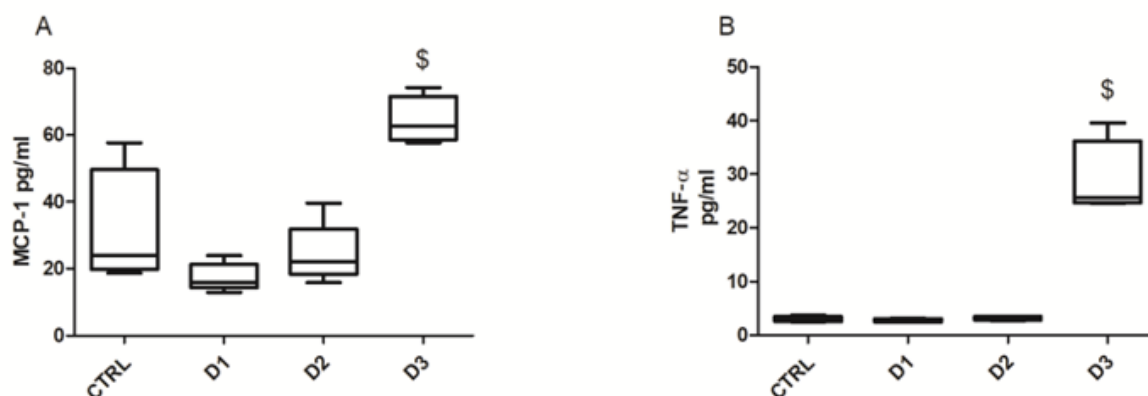


Figura 10. Citocinas musculares após LIEF. Concentração muscular de MCP-1 (A) e TNF- α (B), expressa em pg/ml. (\$) diferente em relação a todos os grupos analisados. CTRL, n=5; D1, n=5; D2, n=5 e D3, n=4. ANOVA uma via seguida pelo post-hoc de Games Howell, $P < 0,05$.

Na figura 11 estão demonstrados os resultados de IL-4 e IL-13. A concentração de IL-4 (figura 11C) não foi significativamente diferente em todos os outros momentos, porém foi observada uma tendência de diminuição no terceiro dia comparado ao segundo ($p = 0,07$) com médio tamanho de efeito ($F = 0,57$). Já a concentração de IL-13 foi significativamente maior no terceiro dia em comparação aos outros dias e ao grupo controle (Figura 11D).

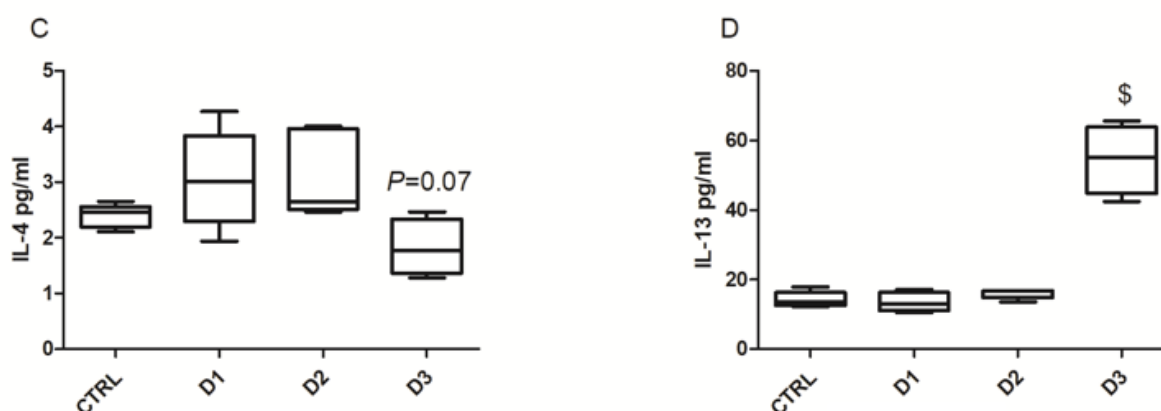


Figura 11. Citocinas musculares após LIEF. Concentração muscular de IL-4 e IL-13, expressa em pg/ml. (\$) diferente em relação a todos os grupos analisados. CTRL, n=5; D1, n=5; D2, n=5 e D3, n=4. ANOVA uma via seguida pelo post-hoc de Games Howell, $P < 0,05$.

Padrão similar foi encontrado para IL-1 β , INF- γ e IL-6 que forma maiores no terceiro dia em relação aos outros momentos e o grupo controle ($p < 0,05$) (Figuras 12E, 12F e 12G).

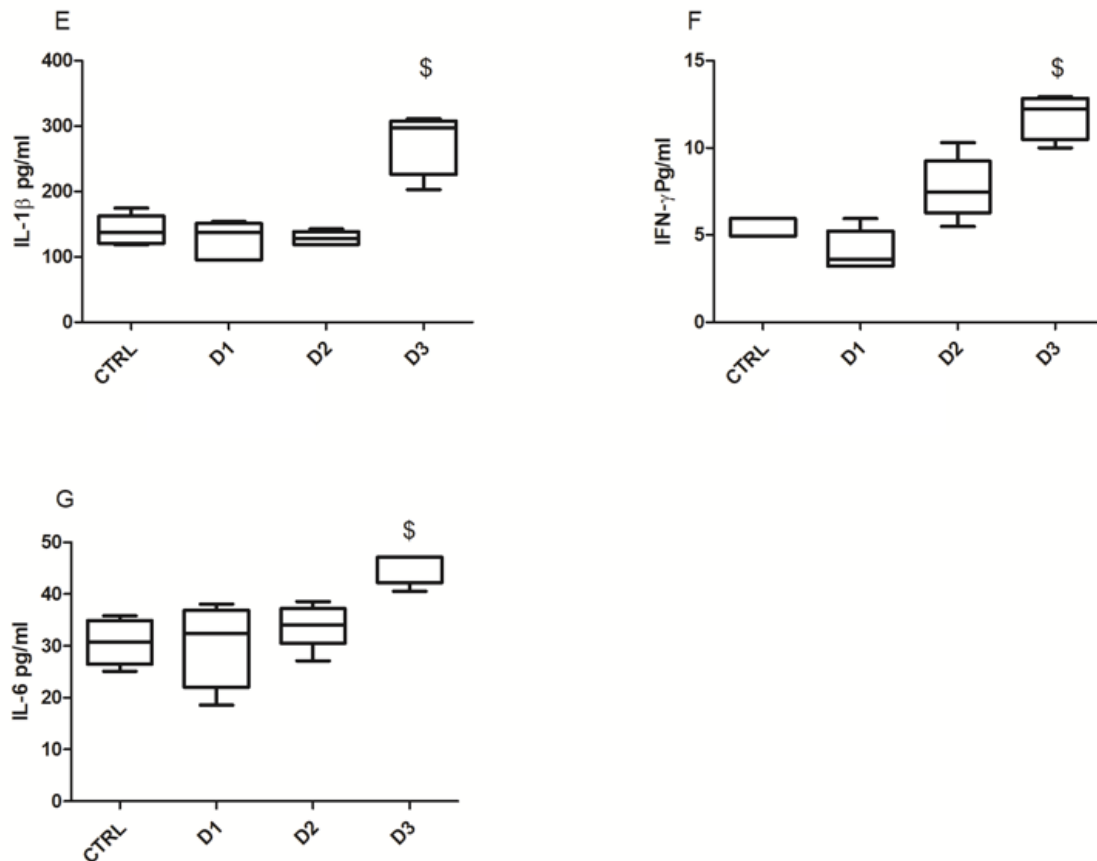


Figura 12. Citocinas musculares após LIEF. Concentração muscular de IL-1 β (Figura 12E), IFN- γ (Figura 12F) e IL-6 (Figura 12G) expressa em pg/ml. (\$) diferente em relação a todos os grupos analisados. CTRL, n=5; D1, n=5; D2, n=5 e D3, n=4. ANOVA uma via seguida pelo post-hoc de Games Howell, $P < 0,05$.

Não obstante, por meio de *western blot*, nós também realizamos análises para determinar a expressão de proteínas envolvidas com os processos analisados. Na figura 13 estão demonstradas as expressões relativas de AMPK-1 α (Figura 13A) e pP65 (Figura 13B), na quais não observamos diferença estatística entre o D3 e o controle.

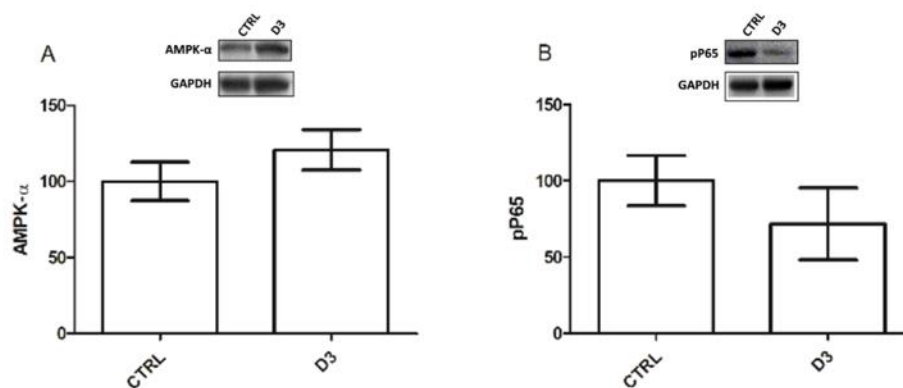


Figura 13. Western do músculo TB após LIEF. Expressão de AMPK-α (Figura 13A) e pP65 (Figura 13B). Resultados expressos em quantidades relativas de GAPDH. CTRL, n=4 a 6 e D3 n=3 a 5. Teste T não pareado de duas saídas foi utilizado, $P < 0,05$.

A expressão de P65 total e GR estão demonstradas nas figuras 14A e 14B respectivamente e não houve diferença entre elas no terceiro dia comparado ao seu respectivo grupo controle. Contudo, em relação a P65 total, nós observamos uma tendência de diminuição no terceiro dia com forte tamanho de efeito ($p = 0,07$, $F = 1,36$).

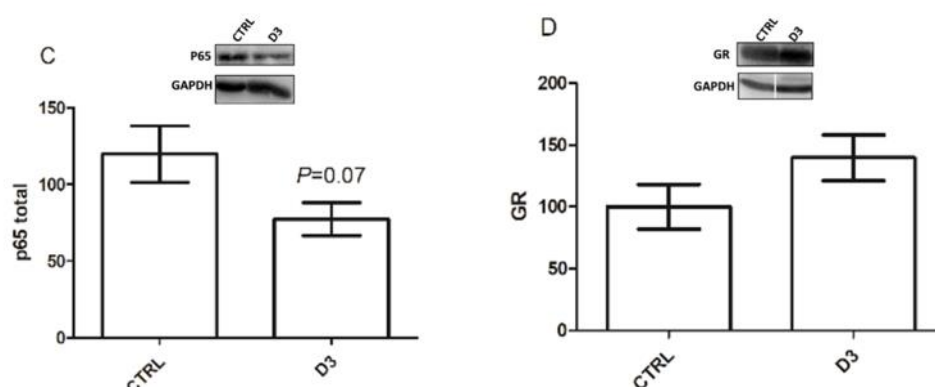


Figura 14. Western do músculo TB após LIEF. Expressão de P65 total (Figura 14A) e GR (figura 14B). Resultados expressos em quantidades relativas de GAPDH. CTRL, n=4 a 6 e D3 n=3 a 5. Teste T não pareado de duas saídas foi utilizado, $P < 0,05$.

Ainda, apesar de não apresentarem diferença significativa em comparação ao seu respectivo grupo controle, a expressão de GR apresentou correlação positiva com a AMPK-1 α (figura 15 F) (C.C= 0,82 e $p < 0,05$). Com relação à expressão de ACHR α 7 não houve diferença entre o D3 e o controle (Figura 15E).

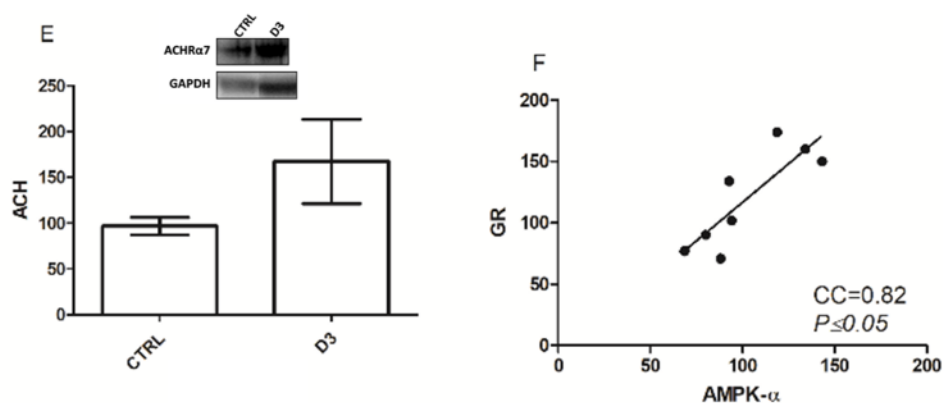


Figura 15. Western do músculo TB após LIEF. ACHR α 7 (Figura 15E) e a matriz de correlação entre GR e AMPK- α (Figura 15F). Resultados expressos em quantidades relativas de GAPDH. CTRL, n=4 a 6 e D3 n=3 a 5. Teste T não pareado de duas saídas foi utilizado, $p < 0,05$.

CAPITULO V

5.0-DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

5.1- DISCUSSÃO

Diversas estratégias têm sido propostas para auxiliar nos processos de regeneração muscular e reversão dos processos inflamatórios decorrente das lesões musculares. Nas LIEFs, as estratégias mais comuns são as intervenções criogênicas (Singh et al., 2017) e o uso de alguns fármacos anti-inflamatórios (Lapointe et al., 2002), que tem como principal foco a redução de sintomas associados a inflamação e dores musculares tardias (Lewis et al., 2012).

No entanto, o uso de fármacos anti-inflamatórios, para minimizar os sintomas secundários da inflamação muscular são limitados, pois poucas são as estratégias que conseguem agir efetivamente na diminuição destes processos sem que afete significativamente nos processos de regeneração muscular. Esta dificuldade se potencializa quando as lesões induzidas são realizadas de forma proposital, como no dano muscular por contração muscular excêntrica, que visa a estimulação dos processos de hipertrofia (Paulsen et al., 2010a; Paulsen et al., 2010b; Paulsen et al., 2012).

Na figura 16, demonstramos o efeito dos medicamentos anti-inflamatórios sobre os processos de lesão e regeneração muscular após as LIEFs, pontuando que, se por um lado os usos de drogas anti-inflamatórias aliviam os sintomas secundários como o processo de dor muscular tardia, por outro, pode comprometer significativamente as adaptações musculares induzidas pelo treinamento físico.

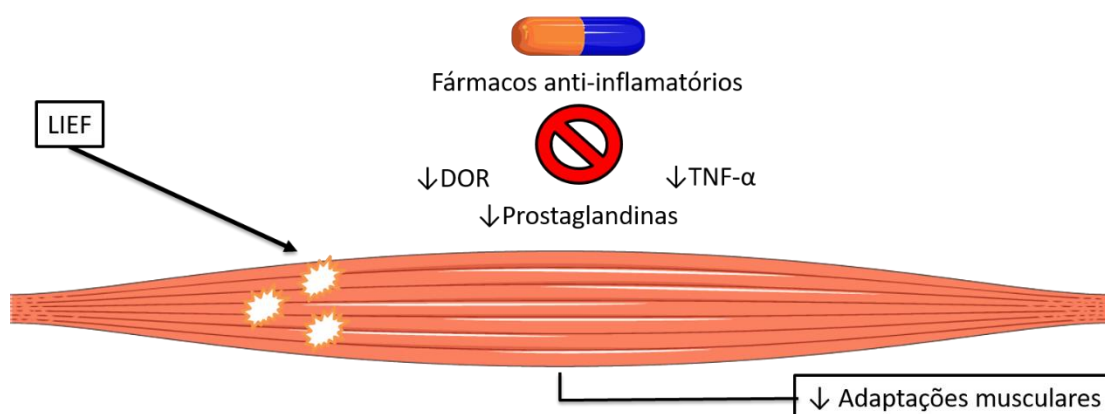


Figura 16. O efeito dos medicamentos anti-inflamatórios sobre os processos de regeneração muscular após as lesões musculares agudas e após as LIEFs. Após as LIEFs, os usos de fármacos anti-inflamatórios ocasionam a diminuição de sintomas secundários como as dores tardias. No entanto, a redução dos processos inflamatórios também podem inibir parcialmente os processos de adaptação muscular induzida pelo treinamento físico.

Entretanto, a necessidade de compreensão dos mecanismos celulares que controlam o processo de lesão e regeneração após as LIEFs são necessárias para a criação de estratégias de recuperação muscular e as possíveis adaptações musculares oriundas advindas do treinamento físico. Neste sentido, o nosso estudo teve como objetivo quantificar diferentes populações Mφs $Ly6C^+$ e $Ly6C^-$ após protocolo de LIEF *downhill*. Ainda, quantificar o papel de algumas citocinas e fatores de transcrição envolvidos nos processos de regeneração muscular após LIEF.

Deste modo, um resumo teórico dos nossos achados pode ser interpretado na figura 17, onde propomos a seguinte sequência de eventos:

Primeiro, o protocolo *downhill* foi responsável por induzir alterações no músculo tríceps que desencadearam todas as respostas evidenciadas no dia três. Deste modo, nós creditamos que estas mudanças decorreram devido a micro lesões induzidas pelo exercício físico já evidenciada em diversos estudos anteriores (Armstrong et al., 1983a; Armstrong et al., 1983c; Chen et al., 2007b; Delp et al., 1999; Hamann et al., 2012; Tsivitse et al., 2003). Entre o segundo e o terceiro dia, foi observado um aumento na secreção de MCP-1, responsável pelo recrutamento de monócitos da corrente sanguínea facilitando a sua diferenciação em Mφs no músculo esquelético. Em camundongos, um dos principais marcadores dos Mφs oriundos dos monócitos é a expressão de $Ly6C^+$. Ou seja, nós acreditamos que os Mφs $Ly6C^+$ são em sua maioria recrutados dos monócitos, também positivos para $Ly6C$ (Arnold et al., 2007; Mounier et al., 2013).

Concomitantemente ao recrutamento de monócitos e Mφs no terceiro dia, nós também observamos uma correlação negativa entre os subtipos de Mφs e um aumento significativo de várias citocinas com efeitos pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IFN- γ , e IL-1 β . Neste sentido, nós hipotetizamos que a secreção de MCP-1, junto com a secreção das citocinas pró-inflamatórias pode estar associada com a diferenciação de Mφs residenciais Ly6C⁻ em favor do fenótipo Ly6C⁺. No entanto, esta hipótese ainda deve ser confirmada neste modelo.

Apesar de todas as citocinas analisadas serem secretadas por diversos tipos celulares e também serem motivadas pela realização do exercício físico agudo, o fato de elas se elevarem somente no terceiro dia, nos leva a sugerir que a secreção destas moléculas foi motivada pelas inflamações locais decorrentes da realização do exercício e não pelas alterações resultantes do metabolismo energético da atividade aguda. Ainda, outro importante indicativo sobre a origem destas citocinas é a sua elevação simultânea ao aumento de Mφs do tipo Ly6C⁺ 3 dias após a realização do protocolo de exercício físico *downhill*.

Por fim, nós também sugerimos que a presença destas citocinas são responsáveis por modular o comportamento das células satélites como já demonstrado em estudos anteriores, que analisaram os efeitos da IL-6 (Serrano et al., 2008), TNF- α (Chen et al., 2007a) e IL-13 (Jacquemin et al., 2007) nos processos de miogênese.

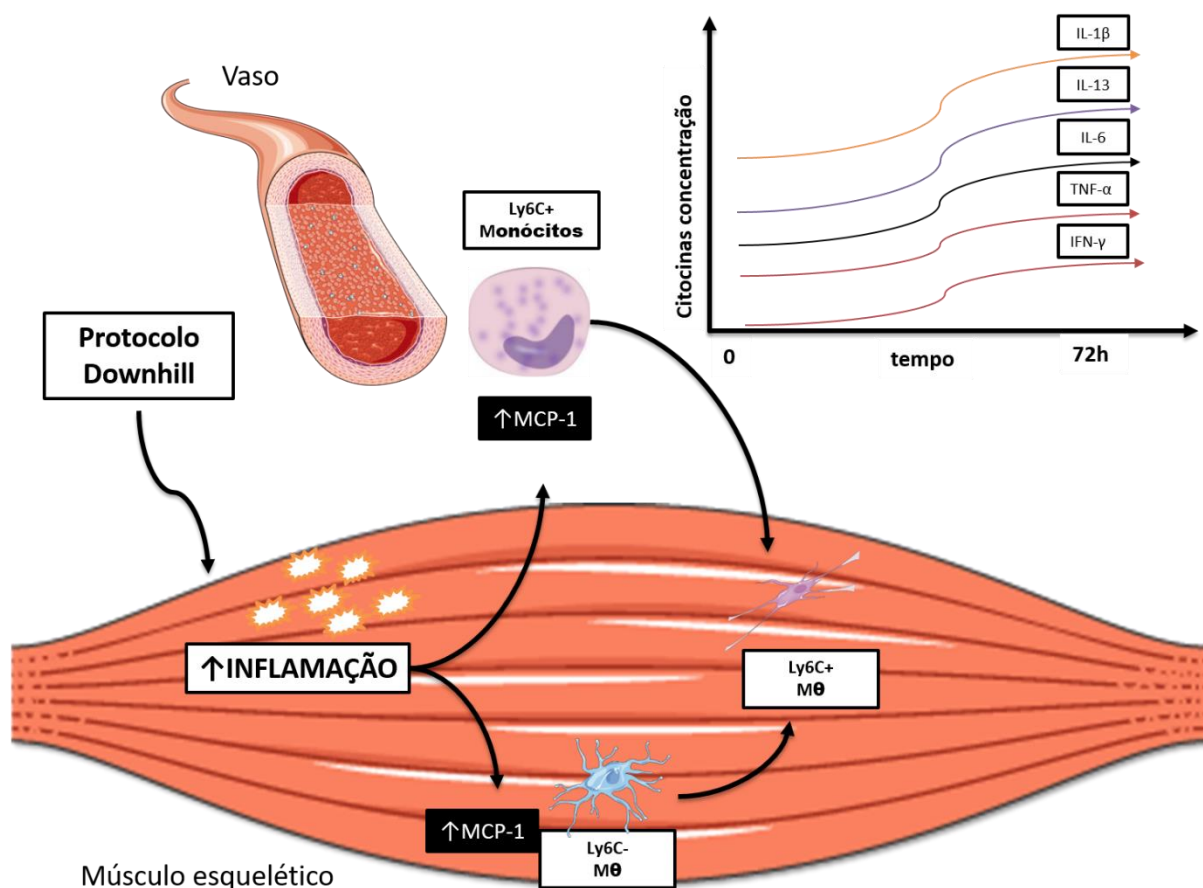


Figura 17. Hipótese dos eventos observados. Sequência de eventos após o protocolo *downhill* de exercício físico no músculo tríceps braquial de camundongos.

O Protocolo de exercício físico em *downhill* foi desenhado por Armstrong e cols. no ano de 1983. Este estudo, foi um dos primeiros a observar que a inclinação da esteira se correlacionava diretamente com as alterações estruturais nas fibras do músculo esquelético. Também foi observado que dependendo da inclinação, positiva ou negativa, o exercício ativa vias metabólicas distintas, sendo a predominância glicolítica na subida e oxidativa na descida. Fundamentalmente, notou-se que os exercícios físicos em subida, demandavam maior esforço consequentemente ocasionando um maior estresse metabólico nas fibras musculares comparado ao exercício físico em declive. Em contrapartida, apesar da demanda metabólica ser diferente comparada a subida, o exercício físico em descida promovia maior desestabilização estrutural nas fibras musculares devido ao componente excêntrico (contra gravidade) sobrecarregando sobremaneira a estrutura dos sarcômeros durante a atividade.

Dentre as peculiaridades descritas por Armstrong, destacamos que na descida, ocorriam as maiores alterações na musculatura esquelética comparadas as corridas em subida (Armstrong et al., 1983a; Armstrong et al., 1983c). Este protocolo também demonstrou que a velocidade e a inclinação fazem com que a intensidade do exercício seja equivalente ao limiar anaeróbio dos animais e que a inclinação utilizada (-16°) é a máxima inclinação sem que os animais comece a deslizar (Armstrong et al., 1983c).

Originalmente, o protocolo *downhill* foi desenvolvido para ratos, no entanto, alguns motivos nos levaram a utilizá-lo em camundongos, dentre eles, a disponibilidade de anticorpos para a determinação dos subtipos de Mφs em camundongos que ainda é consideravelmente maior comparado aos modelos que utilizam ratos. Ademais, a utilização de camundongos nesse momento nos permitirá comparar nossos resultados com experimentos futuros utilizando modelos de camundongos geneticamente modificados para a análise do envolvimento de possíveis proteínas chaves que possam controlar os processos analisados (Minari et al., 2015; Minari et al., 2017).

Em humanos, alguns estudos se dedicaram a analisar qual seria a etiologia das LIEFs. Assim, foi postulado que as alterações decorrentes da contração muscular excêntrica se devem à desestruturação dos sarcômeros, unidade funcional responsável pela contração muscular.

Após a contração muscular excêntrica os sarcômeros sofrem estiramento que levam a duas principais consequências, diminuição da capacidade de geração de força ou em situações mais intensas o rompimento de sua membrana. Indubitavelmente, ambas as alterações explicam o porquê após exercícios físicos excêntricos ocorre a diminuição da capacidade de geração de força e consequentemente o desequilíbrio intra-plasmático de íons Ca^{++} responsáveis por induzir a inflamação e as lesões tardias (Proske and Allen, 2005; Proske and Morgan, 2001).

Contudo, uma vez estabelecida a ruptura das membranas dos sarcômeros, e aumento no influxo de Ca^{++} , consequentemente ocorre o a ativação de algumas vias proteolíticas, o que facilita o aparecimento das necroses e o recrutamento de células inflamatórias (Butterfield et al., 2006; Proske and Allen, 2005; Proske and Morgan, 2001). Deste modo, alguns estudos já demonstraram que após a realização de alguns exercícios físicos excêntricos, o acúmulo de células inflamatórias pode persistir de 3

a 7 dias dependendo da intensidade de lesão gerada (Minari et al., 2015; Minari et al., 2017; Smith, 1991).

Inicialmente, para determinarmos a presença dos Mφs totais nos músculos após LIEF, nós avaliamos a quantidade total de células positivas para F4/80. Contudo, apesar de ter observado variabilidade nos grupos musculares analisados, nossos resultados indicam que o exercício foi responsável por promover um recrutamento homogêneo de Mφs nos músculos analisados. Todavia, comparando os grupos musculares isoladamente, observamos elevações de células positivas no TA no segundo e terceiro dia e no QUAD no segundo dia comparado ao seu respectivo CTRL, o que sugere que estes músculos sofreram maior recrutamento de Mφs após o exercício em *downhill*.

No entanto, apesar de não observarmos aumento significativo de F4/80 no músculo TB, nós optamos pela sua utilização devido alguns motivos:

O primeiro deles, foi pela pequena quantidade de Mφs nos outros grupos musculares analisados, que na melhor das hipóteses resultaram em um ligeiro aumento no GAST no D1 comparado ao seu grupo CTRL. Outro motivo, foi que para as análises subsequentes, por meio de citometria de fluxo, a quantidade de células positivas para CD45⁺ eram maiores no TB comparado aos outros grupos musculares.

Neste sentido, para uma boa marcação e dispersão nos *plots* da citometria de fluxo, nós decidimos extrair as células vasculares de *pools* compostos pelos TBs das duas patas dianteiras ao invés de realizar um *pool* celular de vários animais. Por fim, nós também optamos pela utilização do TB, devido aos estudos prévios do nosso grupo e de outros demonstrando que este músculo é potencialmente um dos mais afetados durante o protocolo *downhill* (Armstrong et al., 1983a; Minari et al., 2015). Também é importante salientar que apesar do F4/80 ser um dos marcadores mais utilizados para a determinação de Mφs totais, sua utilização singular não é capaz de distinguir os diferentes subtipos de Mφs, o que também nos motivou a procurar técnicas mais eficazes para as análises subsequentes (Austyn and Gordon, 1981; Brigitte et al., 2010; Varga et al., 2016b).

Desde 1983 quando o protocolo *downhill* foi desenvolvido, diversos estudos tem demonstrado que este tipo de protocolo é capaz de induzir importantes alterações no músculo esquelético como as demonstradas na tabela 2, porém de forma fisiológica com menor grau de magnitude comparado aos protocolos de lesão de maior

magnitude, tais como o de estiramento (Lapointe et al., 2002), o de imobilização (Deng et al., 2012) e o de injeções por notexina (Arnold et al., 2007) e cardiotoxina (Mounier et al., 2013). Por outro lado, este protocolo é um dos poucos capazes de induzir um processo inflamatório resultante do esforço físico oriundo dos processos de contração muscular (Minari et al., 2015; Tsivitse et al., 2003).

Diferente do protocolo de LIEF, em lesão severa também é possível observar mais claramente as fases que compõe os processos de lesão e regeneração muscular, com etapas mais precisas e melhor caracterizadas (Brigitte et al., 2010; Hardy et al., 2016). Nas LIEFs a quantificação e determinação das lesões celulares são notavelmente modestas comparada as severas, uma vez que a localização dos pontos de necrose, ocorre de forma dispersa. Além do mais, as lesões podem variar de acordo com o tipo de fibra e recrutamento muscular durante a atividade mecânica (da Rocha et al., 2016; Minari et al., 2015; Tsivitse et al., 2003).

Assim, nós sugerimos que por apresentar um menor calibre, o músculo TA apresentou uma menor variabilidade na quantificação de Mφs totais comparado aos outros músculos de maior espessura, uma vez que a obtenção de dez fotos aleatórias no TA é responsável por ocupar maiores áreas da secção transversa comparado aos outros músculos analisados.

Em estudos prévios, foi observado um aumento significativo de células CD68⁺ um dia após o protocolo *downhill*, seguido pela sua redução no segundo e terceiro dia. Simultaneamente a diminuição de CD68 no segundo dia, nós também observamos elevação de CD163. No entanto, apesar ter sido evidenciado anteriormente por outros grupos após LIEF no mesmo momento (Lapointe et al., 2002; Minari et al., 2017; Tsivitse et al., 2003), nós não encontramos na literatura estudos que aprofundassem a análise deste receptor que nos garantissem que sua expressão é exclusiva dos Mφs.

Deste modo, nossos resultados demonstram que a elevação de Mφs Ly6C⁺ somente ocorreu de forma significativa no TB no terceiro dia após o exercício em *downhill*. Tal achado contraria estudos anteriores, nos quais encontramos aumento preventivo de Mφs inflamatórios. A razão para que esta inconsistência possa ter ocorrido pode ser creditada ao fato de que nos estudos anteriores terem utilizado somente a expressão de CD68, molécula que também já foi relacionada com células endoteliais e neutrófilos, ambas presentes no processo analisado (Gottfried et al., 2008; Matsumoto et al., 2007).

Entretanto, apesar dos nossos resultados indicarem que o recrutamento de Mφs inflamatórios apenas ocorreu de forma significativa três dias após LIEF, não podemos ignorar que a elevação de CD68 desempenha importante papel após as LIEFs, pois seu aumento foi evidenciado em diversos outros estudos com a mesma temática (Lapointe et al., 2002; Minari et al., 2015; Minari et al., 2017; Tsivitse et al., 2003; Yu et al., 2014), inclusive apresentando correlação inversa com a expressão de CD163, outro importante marcador da atividade de Mφs do tipo anti-inflamatórios (Minari et al., 2015; Minari et al., 2017).

Assim, para explicar estes resultados, nós especulamos que a população de células que expressaram CD68 nas primeiras 24 horas pertença predominantemente a populações de neutrófilos (Tsivitse et al., 2003). Esta hipótese se reforça devido a elevação da expressão MCP-1 três dias após a LIEF encontrada em nosso estudo.

A secreção de fatores quimioatrativos como MCP-1 é dos principais indicativos de que monócitos e Mφs estão sendo recrutados para o músculo esquelético após diversos tipos de lesão muscular. Isto se confirma, com os estudos que utilizaram animais *KO* para MCP-1 ou mesmo de seu receptor CCR2 (receptor de MCP-1) onde suas respectivas deleções, dentre outros efeitos foram responsáveis pela inibição do recrutamento de monócitos e consequentemente de Mφs para o músculo esquelético (Contreras-Shannon et al., 2007; Martinez et al., 2010; Shireman et al., 2007).

Ainda, a ausência desta molécula ou do seu receptor também são responsáveis por regular os processos inflamatórios de maneira adequada no músculo após lesão, uma vez que a ausência de monócitos e Mφs faz com que os neutrófilos aumentem a sua capacidade de secretar mieloperoxidase, prolongando os efeitos degenerativos das lesões secundárias induzidas no músculo. Adicionalmente, além de promover um desequilíbrio inflamatório, em ambos os modelos todos os estudos citados demonstraram que sem a presença ou ação de MCP-1, era observado um atraso significativo dos processos de regeneração muscular.

Todavia, além dos trabalhos demonstrarem a importância do MCP-1 para os processos de regeneração muscular, também foi demonstrado algumas peculiaridades, como a substituição do tecido muscular pelo consequente acúmulo de tecido adiposo. Ainda, também foi testada a hipótese de que MCP-1 também poderia promover aumento na proliferação de células miogênicas, que foi descartada após a incubação de MCP-1 com linhagem mioblásticas de células C2C12 (Contreras-Shannon et al., 2007; Martinez et al., 2010; Shireman et al., 2007).

Entretanto, alguns modelos também utilizaram outros tipos de estratégias similares para identificar a participação de monócitos e Mφs após as lesões musculares induzidas, como a utilização clodronato liposomal responsável pela inibição do recrutamento de monócitos. Neste sentido, além de observar o respectivo atraso nos processos de regeneração muscular, também foi observada que a ausência de Mφs foi responsável pela inibição da secreção de fatores de crescimento (Brigitte et al., 2010; Lu et al., 2011a; Lu et al., 2011b; Tonkin et al., 2015).

O IGF-1, é um dos principais fatores de crescimento secretado por Mφs no ambiente de regeneração muscular. A sua ação é indispensável para que ocorra os processos regenerativos. *In vitro*, a presença de IGF-1 é responsável por controlar as manifestações de mioblastos como no aumento da sua proliferação e diferenciação. *In vivo*, além de exibir as mesmas funções observadas *in vitro*, o IGF-1 também é responsável pelo aumento da síntese proteica, e mecanismos associados com a manutenção da massa muscular e hipertrofia (Tonkin et al., 2015).

Contudo, tanto em trabalhos em humanos e animais foi identificado aumento de MCP-1 no músculo, juntamente com o aumento de Mφs (Deyhle et al., 2015; Kawanishi et al., 2016). Em outro estudo após o protocolo de exercício físico resistido aumento recíproco de MCP-1 juntamente com aumento de Mφs dois dias após protocolo de exercício físico. Em animais, foram identificadas associação entre MCP-1 e F4/80 tanto no músculo após a realização do protocolo *downhill* de exercício quanto no tecido adiposo de camundongos obesos (Kawanishi et al., 2016; Kawanishi et al., 2012; Kawanishi et al., 2010).

Assim, nossas análises indicam que o aumento de Mφs *Ly6C*⁺ é devido ao recrutamento de monócitos oriundos da corrente sanguínea e recrutados por MCP-1 no terceiro dia após o exercício em *downhill* (Geissmann et al., 2003). Neste sentido, até onde observamos o aumento do número de Mφs neste momento ocorreu em concomitância com o decréscimo da frequência de Mφs *Ly6C*⁻, subtipo celular relacionado a população de Mφs residentes. Ainda, nossas correlações indicam que estes Mφs *Ly6C*⁻ podem potencialmente estar se convertendo em *Ly6C*⁺, via aumento de IL-6, IL-1β e IFN-γ, moléculas com potente efeito pró-inflamatório (Chazaud et al., 2009; Tidball and Villalta, 2010).

Em cultura celular, de maneira isolada, é bem descrito na literatura que a secreção de IL-6, IL-1β e IFN-γ não só induzem, mas são capazes de perpetuar as

respostas inflamatórias frente a diversos desafios fisiológicos, inclusive em processos de inflamações crônicas (Cheng et al., 2008; Croker et al., 2003; De Rossi et al., 2000; Farmawati et al., 2013).

Contudo, apesar da concentração dessas moléculas terem aumentado de forma conjunta, alguns estudos identificaram as suas funções isoladas nos processos relacionados a regeneração muscular (Arnold et al., 2007; Cheng et al., 2008; Tidball, 1995; Tidball and Villalta, 2010). A presença de IFN- γ foi identificada nos processos homeostáticos de reparo do músculo esquelético, onde a sua administração externa mostrou haver capacidade estimuladora nos processos de regeneração muscular inibindo a formação de tecido fibrótico. Em cultura de células musculares foi demonstrado que a sua administração aumenta a expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), aumento na expressão de moléculas de adesão como a ICAM-1 e fundamentalmente responsável pelo aumento da secreção de MCP-1 (Llovera et al., 1998; Mantegazza et al., 1991; Reyes-Reyna and Krolick, 2000).

No estudo de Ming et al., 2008 foi demonstrado que IFN- γ é uma das principais moléculas inflamatórias envolvidas com os processos proliferação e fusão de mioblastos. Assim, além de associar a secreção de IFN- γ com o acúmulo de leucócitos no músculo, o estudo de Ming também demonstrou que a expressão de receptores de IFN- γ estavam expressos em diversos tipos celulares, inclusive nos mioblastos em fase de proliferação muscular (Cheng et al., 2008).

Além disso, neste mesmo estudo foi demonstrado que a administração de anticorpos bloqueadores de receptor de IFN- γ inibiu a sua ativação diminuindo a proliferação de células miogênicas, culminando também no aumento de tecido fibrótico e extensão no tempo de regeneração muscular. Ainda neste mesmo estudo, a influência do IFN- γ nestes processos foi confirmada utilizando camundongos KO para IFN- γ . Adicionalmente também foi realizado experimentos *in vitro* confirmando a capacidade do IFN- γ de estimular a proliferação de mioblastos (Cheng et al., 2008).

Contudo, é importante salientar que as nossas análises foram realizadas durante três dias após a LIEF, e que as elevações dos parâmetros avaliados podem perdurar por mais tempo, ainda influenciando os processos de miogênese após a realização do exercício físico. Todavia, em recente estudo, utilizando o mesmo desenho experimental, porém em ratos, foi demonstrado que os M ϕ s inflamatórios

apresentavam redução significativa no sétimo dia após o protocolo de exercício físico agudo *downhill* (Zuo et al., 2018).

Em relação a IL-6 e exercício físico, alguns ponderamentos devem ser descritos. O primeiro deles é que a IL-6, é uma proteína com funções pleiotrópicas que pode agir e exibir funções em diferentes órgãos e tecidos dependendo do desafio fisiológico a que é submetida. Durante a realização do exercício físico, as contrações musculares, juntamente com as mudanças metabólicas locais, fazem com que o músculo secrete esta miocina, conferindo função no metabolismo energético, como aumento da glicogenólise no fígado, lipólise no tecido adiposo e aumento da captação de glicose pelo músculo (Pedersen et al., 2007; Pedersen et al., 2003; Pedersen et al., 2004; Petersen and Pedersen, 2006).

No entanto, o objetivo de termos analisado as concentrações de IL-6 no nosso modelo experimental, não foi para identificar seu papel sobre o metabolismo energético após o exercício físico, e sim observar seu potencial mecanismo associado aos processos regeneração muscular e hipertrofia. Em relação aos processos regenerativos, em animais KO para IL-6, foi demonstrado que essa citocina também é fundamental para os processos adequados de reestabelecimento do músculo esquelético (Washington et al., 2011).

Após atrofia induzida por desuso em modelo de animais KO para IL-6, foi demonstrado que os animais selvagens aumentaram a expressão de IL-6, IGF-1, MyoD e Myogenina, 1 dia após o período de recuperação muscular, o que não foi observado nos animais geneticamente modificados. Neste sentido este estudo sugere que a IL-6 está intimamente envolvida com os processos de regeneração muscular, principalmente nos períodos iniciais motivando os processos de proliferação celular (Washington et al., 2011).

Contudo, alguns estudos também demonstraram que a IL-6 pode estar associada com os processos de hipertrofia muscular após a realização de protocolos de exercício físico excêntrico (Begue et al., 2013). Após treinamento físico e realização de protocolo resistido agudo em ratos, foi demonstrado que a expressão de IL-6 e a ativação da via da stat-3 estão associados com o aumento da área de sessão transversa do músculo flexor digital profundo 2, 6 e 72 horas após a última sessão de exercício físico. Ainda, também foi demonstrado que este mecanismo de hipertrofia

foi mediado pela estimulação de fatores associados com a ativação de células satélites (Begue et al., 2013).

Contudo, em nosso presente estudo acreditamos que a IL-6 pode ter desempenhado o mesmo processo de proliferação das células satélites, suportando os mecanismos que podem estar potencialmente envolvidos com os processos de hipertrofia muscular.

Neste sentido, apesar de termos avaliado somente até o terceiro dia, nós observamos que a expressão de algumas proteínas que podem estar envolvidas com o desfecho dos processos inflamatórios, podem estar envolvidas com a regeneração e/ou hipertrofia muscular, como é o caso dos receptores de acetilcolina, glicocorticoides e as proteínas associadas com a via do NFK-B.

Em relação aos receptores de acetilcolina, especificamente sobre os nicotínicos AChR-7 α , alguns estudos demonstraram que a sua ativação é um importante regulador inflamatório das células do sistema imunológico, inclusive regulando a produção de diversas citocinas pelos M ϕ s. Ainda, estes resultados também foram confirmados *in vitro* após estimulação por lipopolissacarídeo em M ϕ s humanos. (Alsharari et al., 2013; Bernik et al., 2002; Borovikova et al., 2000).

Além destes estudos, os potenciais envolvimento dos receptores nicotínicos de acetilcolina no controle inflamatório já foram testados em outros modelos, como no de sepse (Borovikova et al., 2000); danos na estrutura tegumentar por meio de raios ultravioleta (Osborne-Hereford et al., 2008); e doenças crônicas, como a artrite reumatoide (van Maanen et al., 2009) e dores neuropáticas (Alsharari et al., 2013; Parada et al., 2013).

No músculo esquelético, poucos foram os estudos mostrando o efeito dos receptores nicotínicos sobre o controle dos processos inflamatórios. Em modelo de distrofia muscular, foi verificada a influência endógena de acetilcolina sobre os receptores nAChR α 7. Para isso, foram utilizados camundongos selvagens e KO para nAChR α 7. Após realizar lesão muscular induzida por bupivacaina, foi demonstrado que os animais selvagens apresentavam menor inflamação e melhores parâmetros regenerativos comparados aos animais KO para nAChR α 7, inclusive com menor quantidade de tecido fibrótico. Deste modo, este estudo sugeriu que a ativação deste receptor pode ser utilizado como uma potencial estratégia para o desenvolvimento de

fármacos que ajudam no processo de regulação inflamatória associado aos processos de regeneração muscular (Leite et al., 2010).

A expressão de nAChR α 7 também foram associadas com a inibição da via do NFK-B no músculo esquelético (Leite et al., 2010). A família do NFK-B consiste em cinco subunidades p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50 e p52 e quando sua via é ativada, o resultado mais comum é a translocação do complexo heterodímero p50–p65 presente no citoplasma, se translocando para o núcleo, resultando na síntese de sua proteína específica (Verma et al., 1995). Não obstante, diversos são os estímulos que podem levar a ativação deste complexo, dentre eles os estímulos pró inflamatórios, proteínas bacterianas, partículas virais, fatores de crescimento e produção de espécie reativas de oxigênio (Chen et al., 2007a; Taggart et al., 2005; Yasukawa et al., 2003).

A desregulação da atividade desta via pode resultar em ativações crônicas de IKK ou do complexo p50-p65, alterações características de diversas fisiopatologias, como nos processos de desenvolvimento tumoral, artrite reumatoide, sepse, cardiopatias, diabetes e distrofias musculares (Hayden and Ghosh, 2004; Karin et al., 2002).

Alguns estudos com animais KO para p65, demonstraram que a sua ativação promove um aumento na expressão de MyoD em fibroblastos embrionários (Bakkar et al., 2008). Em animais MDX, modelo experimental que simula a distrofia muscular de Duchene, demonstrou que a depleção de p65 reduziu a inflamação exacerbada aprimorando os parâmetros regenerativos do músculo esquelético (Acharyya et al., 2007).

Outro estudo, também utilizando animais KO para p65, especificamente nas KO de p65 nas células tronco do músculo foi observado aumento proliferação e diferenciação de células miogênicas. Ainda, estes resultados sobre a proliferação de células miogênicas foram confirmados por meio da inibição farmacológica do complexo NFK-B (Lu et al., 2012).

Entretanto, quando o meio de cultura é composto por diferentes moléculas, com ações fisiológicas distintas o desfecho celular nem sempre é o mesmo, um bom exemplo deste fenômeno é quando a ativação da via do NFK-B ocorre por meio da ativação de IL-6 juntamente com a ativação do TNF- α , que é capaz de aumentar a incorporação de p65 para o núcleo celular via ativação dos receptores GP130 e TLR-4 (Lang et al., 2003). Em contrapartida, em um ambiente cujas concentrações de IL-

10 encontram-se aumentadas, a ativação da SOCS (*Supressor of Cytokine Signaling*) promove a inibição do receptor GP130, inibindo os processos inflamatórios e alterando significativamente o desfecho da resposta celular (Crocker et al., 2003; Lang et al., 2003; Yasukawa et al., 2003).

In vivo e *in vitro*, as ações de IL-10 demonstraram importante função nos processos de regeneração muscular, modulando tanto os subtipos de Mφs como também a diferenciação e fusão de mioblastos (Tidball, 2017). Neste sentido, após incubar linhagens de Mφs com IL-10, foi observado um aumento na expressão de marcadores anti-inflamatório, como aumento na expressão de CD163 e arginase-1 (Sulahian et al., 2000).

Ainda, além de controlar as características inflamatórias, também foi demonstrado que a estimulação de IL-10, é uma das principais reguladoras da atividade fagocítica dos Mφs, etapa fundamental que regula a transição de Mφs nos processos de regeneração muscular (Arnold et al., 2007; Villalta et al., 2009) .

No estudo de Deng et al., 2011 foram examinadas as funções de IL-10 sobre os processos de regeneração, visando compreender também a participação de IL-10 sobre os processos de mudança fenotípica de Mφs após lesão muscular induzida no tibial anterior de camundongos. Neste estudo, foi demonstrado que nos primeiros dias ocorreu aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, que foram substituídas ao final do processo por elevações de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10.

Assim, comparado aos camundongos KO para IL-10, duas foram as principais observações deste estudo; a primeira delas é que não houve prejuízo nos processos de regeneração muscular. O segundo, foi que a ausência de IL-10 nos animais KO, foi responsável por promover um aumento nas concentrações de IL-6, sugerindo que essa citocina foi responsável por assumir um mecanismo de controle compensatório. Por fim, a principal observação deste estudo foi demonstrar que nos animais KO para IL-10, não apresentou aumento na expressão de marcadores associados a mudança fenotípica de Mφs (Deng et al., 2012).

Outro exemplo de molécula, capaz de controlar a inflamação é a secreção de SLPI (*Secretory Leucoproteases Inhibitor Factor*) mediada por populações leucocitárias. O SLPI é composto por 107 aminoácidos com peso molecular de (11.7 kDa). Como molécula, sua estrutura é composta por dois diferentes compostos proteicos que apresentam atividade anti-protease, servindo como bloqueadora de

diversos compostos secretado por diversos tipos celulares e patógenos que podem promover e amplificar os efeitos proteolíticos também associado a injúrias musculares (Taggart et al., 2005; Taggart et al., 2002).

A sua secreção pode ser mediada por diversos estímulos, um deles é a secreção de citocinas pró-inflamatórias associadas aos mecanismos de apoptose e final da atividade fagocítica de Mφs no músculo esquelético (Arnold et al., 2007; Odaka et al., 2003). Dentre outras funções esta molécula também é responsável pela inibição da via do NFK-B, bloqueando a atividade proteolítica do sistema ubiquitina-proteassoma no ambiente intracelular (Nathan, 2002; Taggart et al., 2005; Taggart et al., 2002; Urso et al., 2007).

Em linhagens monocíticas os estudos de Taggart et al., 2002 e 2005, demonstraram que a SLPI é capaz de inibir a ativação da via NFK-B, ubiquitinando a proteína IκBα. Também foi demonstrado que a SLPI inibe a ação dos receptores de IL-1β, sugerindo que essa molécula possa agir regulando os efeitos pró inflamatórios independente do aumento da de citocinas no local (Taggart et al., 2002).

Em 2005, o mesmo grupo demonstrou que a incubação de SLPI também com linhagem de células monocíticas afeta diretamente a ativação da via NFK-B, prevenindo a adesão de p65 com a sua respectiva região nuclear (Taggart et al., 2005). No atual estudo nós não evidenciamos a participação de IL-10 nem de SLPI, pois ambas as moléculas foram evidenciadas em nossos estudos anteriores, cujo qual, observamos importante envolvimento no controle inflamatório dois dias após a realização do protocolo *downhill* (Minari et al., 2015; Minari et al., 2017). Na presente tese, optamos por evidenciar alguns outros fatores como o controle neuronal periférico da inflamação, analisando a expressão de dos nACHR-7α e a expressão dos GRs.

Os GRs pertencem a superfamília dos receptores que sofrem ação nuclear, similar a ação dos receptores hormonais da tireoide, esteroidais e os retinóicos. Sua estrutura consiste na ligação de 777 aminoácidos com três domínios: o N-terminal, o DNA-ligante e o ligante C-terminal (Chrousos and Kino, 2005). Uma vez estimulado o complexo receptor hormônio dos glicocorticoideglicocorticoides se translocam do citoplasma até o núcleo, ligando se na região específica de transcrição no DNA (Chrousos and Kino, 2005; Kino and Chrousos, 2004). O Ligante terminal “DNA-bound” regula a transcrição de diversas proteínas ocasionando as suas principais funções (Chrousos and Kino, 2005; Lonard et al., 2007).

No nosso estudo, os receptores de glicocorticoides foram analisados por dois motivos, o primeiro deles é que alguns estudos demonstraram *in vitro* que a sua ativação é fundamental para que os Mφs adquiram seu fenótipo anti-inflamatório, aumentando a expressão de CD163 (Heideveld et al., 2018), o mesmo receptor de Mφs elevado no segundo dia após a realização de exercício físico *downhill* (Minari et al., 2015; Minari et al., 2017). Outro motivo é que alguns outros estudos também demonstram que o aumento da sua expressão está relacionado com estados de atrofia muscular inibindo importantes genes relacionados com os processos de atrofia e hipertrofia muscular como a FOXO, Atrogin-1 e MuRF-1 (Schakman et al., 2012; Schakman et al., 2013).

Contudo, poucos estudos examinaram a função dos GRs nos processos de lesão e regeneração muscular *in vivo*, menos ainda foram os estudos que associaram a sua função no músculo ou nos Mφs após as LIEFs. Após protocolo de lesão severa, foi evidenciado em células satélites e em FAPS (células progenitoras fibro/adipogênicas) o papel de sua estimulação *in vitro*, por meio de dexametasona, um dos principais ativadores de GR nas células analisadas. Os resultados encontrados demonstraram que a estimulação por este fármaco, não estimulou a diferenciação de células satélites, sendo a sua principal ação nas células na diferenciação de FAPS.

No mesmo estudo, *in vivo*, foi realizado um transplante de células FAPS para o músculo dos camundongos selvagens em concomitância com a administração de dexametasona após lesão muscular induzida, e foi demonstrado que os animais que receberam a administração do fármaco, aumentaram a adipogênese no tecido muscular nos processos regenerativos comparado aos animais que não foram submetidos a utilização deste fármaco. Ainda, também foi observado que o aumento da adipogênese, foi mediada pela ação da IL-4, que diferente do grupo KO para esta citocina, não foram observados os mesmos resultados. Todavia, estes resultados foram confirmados em cultura de células FAPS na presença ou ausência de IL-4 (Dong et al., 2014).

Além de controlar os processos inflamatórios, a ação dos glicocorticoides por meio de seu receptor é capaz de regular o metabolismo energético, principalmente promovendo a regulação de algumas vias intracelulares como a do AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (Appuhamy et al., 2014). Dentre outras funções a AMPK é

uma proteína responsável por regular o metabolismo energético das células, aumentando a captação de nutrientes preservando a energia para os tecidos periféricos (Nader et al., 2010).

Alguns estudos demonstraram que a ação da AMPK regula a ação dos receptores glicolíticos responsáveis por inibir o metabolismo de carboidratos. No fígado de ratos, a ativação de AMPK, foi capaz de reverter a esteatose hepática promovida pela a ativação dos receptores de glicocorticoideglicocorticoides estimulando o metabolismo de carboidratos. A maioria das ações entre AMPK e os GR parece se dar pela associação da fosforilação da serina 211 e consequente ativação proteína p38 MAPK (MAP KINASES) (Nader et al., 2010).

Em monócitos, a expressão genica de AMPK se correlaciona positivamente com a expressão da proteína zíper de leucina em resposta a ativação dos glicocorticoides. A mesma correlação é identificada perante o aumento do IMC (índice de massa corporal) dos participantes do estudo. Contudo, neste estudo especificamente, os resultados indicam que a ativação de AMPK pode regular o metabolismo energético por meio da ação dos glicocorticoides, principalmente por meio da ação dos GRs, que também já foi relacionada com o desenvolvimento de doenças metabólicas (Nader et al., 2010).

Após lesões musculares induzidas por cardiotoxina, Mounier e cols. (2013) utilizando animais KO específico para AMPK-1 α nos M ϕ s, demonstraram que esta molécula é fundamental para que ocorra a mudança fenotípica de M ϕ s em favor do subtipo Ly6C⁻ impactando profundamente os processos de regeneração muscular. No entanto, apesar de eles não terem evidenciado a expressão de GR, nós acreditamos que a ausência da AMPK-1 α nestes M ϕ s pode ter prejudicado as ações anti-inflamatórias necessárias para a sua mudança fenotípica (Mounier et al., 2013). Contudo, esta sugestão não passa de apenas uma hipótese que deve ser melhor esclarecida.

Para tentar evidenciar a participação destas moléculas após a realização do exercício físico agudo, nós analisamos também o envolvimento de moléculas ligadas a inibição ou ativação da via do NFK-B, como a expressão proteica de pP65, a P65. Neste sentido, escolhemos analisar a expressão destas proteínas no terceiro dia após o exercício em *downhill*, o único momento em que identificamos aumento significativo de M ϕ s Ly6C⁺. Nossos resultados não foram capazes de evidenciar o envolvimento

destas moléculas de forma significativa, porém, identificamos importante tendência (com elevado poder de efeito) da diminuição de P65 total.

Tal achado vão indiretamente de acordo com nossos resultados de estudos anteriores, quando sugerimos que o aumento de SLPI foram um dos possíveis responsáveis pela inibição da via do NFK-B 3 dias após a realização do protocolo *downhill* (Minari et al., 2015; Minari et al., 2017). Na procura de outro fator envolvido com o aumento de Mφs Ly6C+ e o controle inflamatório 3 dias após, nós também evidenciamos a participação da AMPK-1α três associado a expressão de GR.

Assim, nós escolhemos analisar a expressão de AMPK-1α por dois motivos principais, o primeiro é que em estudos prévios foi demonstrado que a ausência desta molécula compromete significativamente o processo de regeneração muscular (Mounier et al., 2013). Um outro motivo, é que a expressão de GR, mediada pela atividade da AMPK, em estudos anteriores, foram possíveis candidatos a apresentarem controle inflamatório após a realização do exercício físico agudo, na qual, GR e AMPK-1α foram associadas ao aumento na expressão de CD163 (Deng et al., 2012; Heideveld et al., 2018; Moestrup and Moller, 2004; Tidball and Villalta, 2010).

Contudo, não identificamos mudanças na expressão de GR e de AMPK-1α três dias após o protocolo *downhill*. No entanto, nós identificamos uma forte correlação positiva entre as duas proteínas, o que sugere que talvez este mecanismo explicitado nos parágrafos anteriores podem estar ocorrendo em nossas análises atuais, uma vez que a correlação positiva entre AMPK-1α e GR foi pontuada, juntamente com o aumento do recrutamento de Mφs e com a secreção de diversas citocinas pró inflamação neste momento.

Todavia, após lesões musculares severas diversos estudos demonstraram que a secreção de TNF-α é fundamental para o controle da atividade de diversos tipos celulares, dentre eles células imunológicas, fibroblastos e células miogênicas (Collins and Grounds, 2001; Lemos et al., 2015; Li, 2003). Ainda, também foi demonstrado que quando o TNF-α é secretado no ambiente de lesão muscular, sua presença é responsável por controlar os processos de miogênese, inclusive modulando o envolvimento das células FAPS (Lemos et al., 2015; Li, 2003).

No estudo de Lemos e cols. (2015), após lesão muscular induzida por notexina, foi demonstrado que a principal fonte de TNF-α no músculo esquelético são os Mφs.

Ainda, também foi demonstrado que a sua secreção é fundamental para que os processos de regeneração muscular ocorram de maneira adequada, pois o seu bloqueio com anticorpo neutralizante ou com a utilização de animais KO demonstrou um atraso significativo nos processos regenerativos, com significativo aumento no acúmulo de fibroblastos mediado pela inibição da apoptose das células FAPS (Lemos et al., 2015).

Outros estudos, também demonstraram que o TNF- α é uma das principais moléculas responsáveis pela regulação dos processos de miogênese, quando a via de ativação da *p38 MAPK (mitogen-activated protein kinases)* é ativada, desencadeando o aumento da expressão de MyoD. (Chen et al., 2007a; Puri et al., 2000). Em nossos estudos anteriores, nós também evidenciamos o aumento abrupto de TNF- α no segundo e terceiro dias após o exercício em *downhill*, e observamos que essa elevação se correlacionou positivamente com a expressão gênica de MyoD. Neste sentido, os nossos resultados nessa Tese sugere que esta molécula também tenha participado de forma significativa na ativação da miogênese três dias após o protocolo *downhill* (Minari et al., 2015).

Além do envolvimento de moléculas pró-inflamatórias, nos parece claro que diferentes classes de citocinas também poderiam estar contribuindo para os processos analisados, tais como algumas citocinas do tipo TH-2 (Deng et al., 2012; Heredia et al., 2013). Por este motivo, nós também avaliamos o envolvimento de IL-4 e IL-13 visando a sua participação nos períodos relacionados ao controle inflamatório após a realização da LIEF,

Indubitavelmente, o efeito da IL-13 nos mais variados tipos celulares é muito semelhante aos efeitos desencadeados pela IL-4, principalmente porque ambas são responsáveis por estimular a subunidade IL-4R α do receptor IL-4, a. Ainda, tanto a IL-4 como a IL-13, dependendo do ambiente envolvido, também podem exibir efeitos pleiotrópicos, associados anteriormente com os M ϕ s do tipo anti-inflamatórios, inclusive em períodos tardios de regeneração muscular (Heredia et al., 2013; Van Dyken and Locksley, 2013; Wu et al., 2011).

No estudo de Heredia e cols. (2013), foi demonstrado que camundongos KO para IL-4R α , apresentaram um atraso significativo nos processos de regeneração muscular após lesão comparado com os animais selvagens. Neste mesmo estudo, procurando estabelecer quais foram os tipos celulares envolvidos com este atraso, foi

evidenciado que nos primeiros dois dias após lesão houve um massivo recrutamento de eosinófilos no local da lesão, e que, os mesmos eosinófilos foram os principais responsáveis pela secreção de IL-4, citocina relacionada aos processos de diferenciação dos mioblastos.

Nós não avaliamos a presença de eosinófilos, no entanto, não podemos deixar de especular que esta população celular pode estar envolvida nos processos analisados, principalmente porque observamos uma tendência na diminuição de IL-4 três dias após o protocolo *downhill* comparado ao segundo dia. O que sugere que essa citocina esteja sendo inibida por algum outro fator 3 dias após o protocolo de LIEF.

Deste modo, nós também acreditamos que essa tendência de diminuição no terceiro dia pode ter sido em consequência de uma retroalimentação negativa ocasionada pelo aumento de diversas citocinas pró inflamatórias, destacadamente pela elevação significativa de IL-1 β , IL-6 e IFN- γ (Kharraz et al., 2013; Nathan, 2002).

Contudo, inicialmente nós escolhemos analisar IL-4 e IL-13 devido diversos estudos associarem as suas elevações com a mudança fenotípica de M ϕ s, principalmente em períodos tardios de regeneração muscular em favor do fenotípico anti-inflamatório (Gordon, 2003; Gordon and Martinez, 2010; Van Dyken and Locksley, 2013). Porém, até onde analisamos, nossos resultados demonstraram que estas citocinas sofrem modificações opostas no terceiro dia após LIEF, sugerindo que diferente do que esperávamos, estas moléculas não parecem estar associadas ao controle inflamatório mediado por M ϕ s, mas sim com um possível mecanismo associado com a ativação de células miogênicas.

Ao nosso ver nossa hipótese se justifica devido as ações de IL-4 e IL-13 apresentarem uma coordenada sequência de funções durante os processos de miogênese (Jacquemin et al., 2007). Todavia, estes processos de regulação da miogênese mediado por estas citocinas, parecem ser mais efetivos na presença de IL-4 (Horsley et al., 2003). Porém, nos passos finais da miogênese, nas etapas de diferenciação foi demonstrado que a presença de IL-13 exibe um papel fundamental no recrutamento das células reservas que ajudam nos processos relacionados com a hipertrofia muscular, mediando ações conjuntas com o IGF-1 (Jacquemin et al., 2007).

Contudo, até onde pesquisamos, o nosso estudo foi um dos poucos a analisar as concentrações de IL-4 e IL-13 no contexto de LIEF. Não obstante, como a IL-6, a

determinação de IL-4 e IL-13 sempre foram analisados em outros estudos envolvendo o exercício físico, porém suas análises foram realizadas em associação com as funções metabólicas no músculo esquelético, sendo poucos os estudos que determinaram o seu envolvimento com os subtipos Mφs e os processos de regeneração e/ou hipertrofia muscular (Paulsen et al., 2010a; Pedersen et al., 2007; Prokopchuk et al., 2007; Rosa Neto et al., 2011).

Especificamente sobre o envolvimento de IL-4 e IL-13 no processo de hipertrofia muscular, identificamos apenas um estudo realizado por Prokopchuk e cols.(2007), onde foram avaliadas as concentrações de IL-4, IL-13 e as respectivas expressões de seus receptores IL-4Ralpha e IL-13Ralpha-1 em biopsia do músculo TB de indivíduos saudáveis. Este estudo foi constituído por seis semanas de treinamento de força e apesar de não analisarem os mecanismos associados a ação destas moléculas, os pesquisadores demonstraram um aumento significativo na expressão de seus receptores, sugerindo uma possível associação entre estas moléculas e os processos que culminaram no aumento da área de secção transversa dos indivíduos (Prokopchuk et al., 2007).

Após protocolo de exaustão também foram evidenciados a secreção de citocinas do tipo TH1 e TH2, representados respectivamente por IL-2 e IL-4 nos músculos sóleo e extensor digital longo de ratos *Wistar*. Os animais foram submetidos ao exercício físico agudo e eutanasiados imediatamente, duas e seis horas após a realização do exercício físico até a exaustão. Um importante resultado deste estudo foi a identificação do aumento de IL-4 seis horas após no músculo EDL, juntamente com o aumento da expressão de MyoD, sugerindo que esta citocina pode também estar associada com os processos de proliferação de células satélites (Rosa Neto et al., 2011).

Todavia, nosso estudo é um dos primeiros a demonstrar que o protocolo de exercício em *downhill* está envolvido na modulação dos dois subtipos distintos de Mφs nos músculos de camundongos. Também demonstramos que as participações destes subtipos se apresentaram de forma distinta comparado aos modelos de lesão severa, onde a elevação dos Mφs LyC6⁺ normalmente se alterna com a elevação de Mφs LyC6⁻ no quarto dia após a lesão e se mantém elevado até o décimo dia após a lesão muscular induzida (Figura 19).

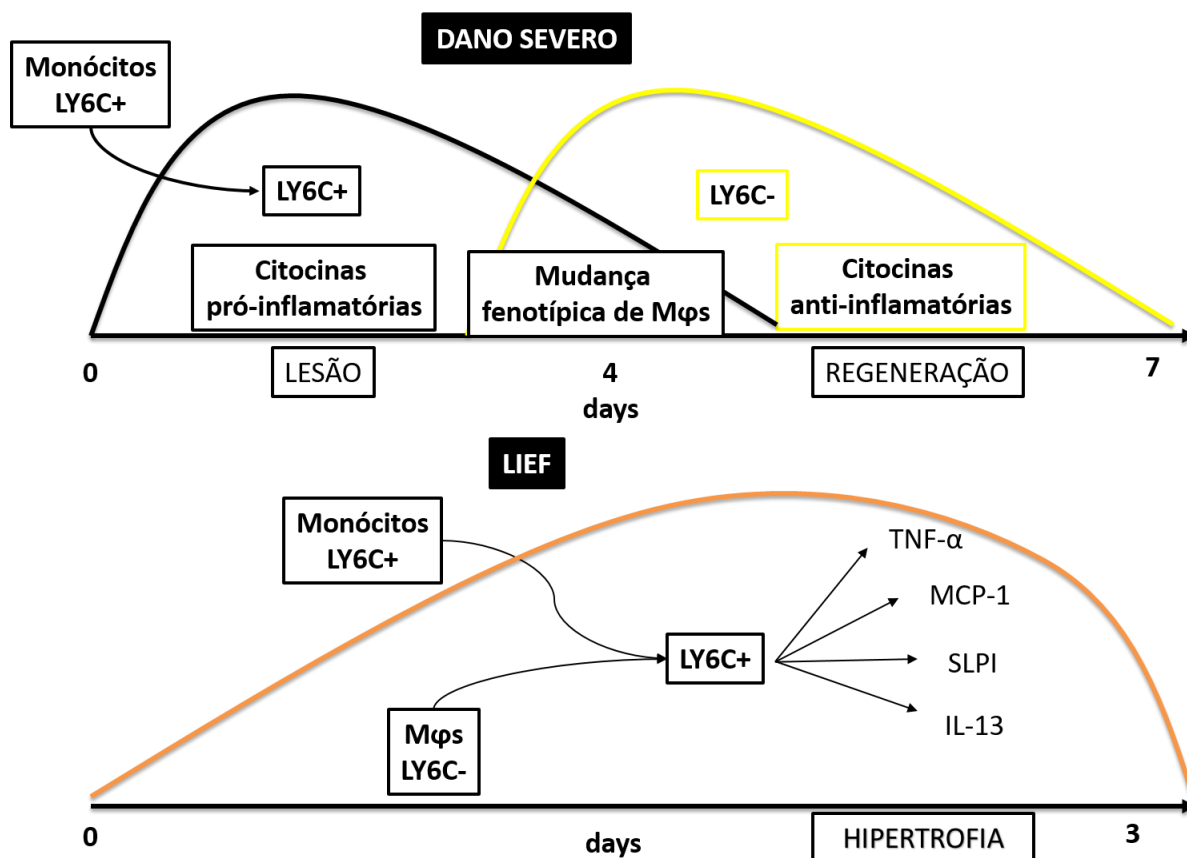


Figura 18. Diferença entre a ação dos subtipos de Mφs após lesões severas e lesão induzida pelo protocolo *downhill*.

5.2- CONCLUSÃO

O exercício físico em *downhill* promoveu recrutamento de Mφs LyC6⁺ no músculo TB junto com elevação de diversas citocinas IL-6, IL-1β, IFN-γ e TNF-α, IL-13 associadas com os mecanismos de miogênese três dias após o protocolo *downhill*. As análises dos receptores neuronais periféricos juntamente com a expressão proteica de P65 sugere que estes mecanismos inflamatórios ocorreram independente da do aumento de AMPK, GR e nACHR-7α e potencial envolvimento da inibição da via do NFK-B.

ANEXO-I APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "MODULAÇÃO COLINÉRGICA E DE GLICOCORTICÓIDES SOBRE A VIA DE TRANSCRIÇÃO NFkB NA MUDANÇA FENOTÍPICA DE MACRÓFAGOS APÓS LESÃO INDUZIDA PELO EXERCÍCIO FÍSICO.", protocolada sob o CEUA nº 9151260314, sob a responsabilidade de **André Luis Araujo Minari** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 24/04/2014.

We certify that the proposal **, utilizing Heterogenics rats, protocol number CEUA 9151260314, under the responsibility of **André Luis Araujo Minari** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 04/24/2014.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de : **Abril a maio/20**

Área: **Psicobiologia/psicobiologia**

Origem: **CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 2 meses**

N: **---**

Linhagem: **Rato heterogênico**

Peso: **250 a 250 g**

Local do experimento:

São Paulo, 06 de março de 2018

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Tatiana Helfenstein
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

REFERÊNCIAS

- Abdelsadik, A., and A. Trad. 2011. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. *Human immunology*. 72:1188-1193.
- Acharyya, S., S.A. Villalta, N. Bakkar, T. Bupha-Intr, P.M. Janssen, M. Carathers, Z.W. Li, A.A. Beg, S. Ghosh, Z. Sahenk, M. Weinstein, K.L. Gardner, J.A. Rafael-Fortney, M. Karin, J.G. Tidball, A.S. Baldwin, and D.C. Guttridge. 2007. Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *The Journal of clinical investigation*. 117:889-901.
- Akira, S. 2009. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*. 85:143-156.
- Alsharari, S.D., K. Freitas, and M.I. Damaj. 2013. Functional role of alpha7 nicotinic receptor in chronic neuropathic and inflammatory pain: studies in transgenic mice. *Biochemical pharmacology*. 86:1201-1207.
- An, Q., M.W. Jin, X.J. An, S.M. Xu, and L. Wang. 2017. Macrophage activation syndrome as a complication of juvenile rheumatoid arthritis. *European review for medical and pharmacological sciences*. 21:4322-4326.
- Appuhamy, J.A., W.A. Nayananjalie, E.M. England, D.E. Gerrard, R.M. Akers, and M.D. Hanigan. 2014. Effects of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling and essential amino acids on mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and protein synthesis rates in mammary cells. *Journal of dairy science*. 97:419-429.
- Armstrong, R.B., M.H. Laughlin, L. Rome, and C.R. Taylor. 1983a. Metabolism of rats running up and down an incline. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 55:518-521.
- Armstrong, R.B., R.W. Ogilvie, and J.A. Schwane. 1983b. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 54:80-93.
- Armstrong, R.B., R.W. Ogilvie, and J.A. Schwane. 1983c. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 54:80-93.
- Arnold, L., A. Henry, F. Poron, Y. Baba-Amer, N. van Rooijen, A. Plonquet, R.K. Gherardi, and B. Chazaud. 2007. Inflammatory monocytes recruited after

- skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 204:1057-1069.
- Austyn, J.M., and S. Gordon. 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European journal of immunology*. 11:805-815.
- Bakkar, N., J. Wang, K.J. Ladner, H. Wang, J.M. Dahlman, M. Carathers, S. Acharyya, M.A. Rudnicki, A.D. Hollenbach, and D.C. Guttridge. 2008. IKK/NF-kappaB regulates skeletal myogenesis via a signaling switch to inhibit differentiation and promote mitochondrial biogenesis. *The Journal of cell biology*. 180:787-802.
- Bar-Shai, M., and A.Z. Reznick. 2006. Reactive nitrogen species induce nuclear factor-kappaB-mediated protein degradation in skeletal muscle cells. *Free radical biology & medicine*. 40:2112-2125.
- Beaton, L.J., D.A. Allan, M.A. Tarnopolsky, P.M. Tiidus, and S.M. Phillips. 2002a. Contraction-induced muscle damage is unaffected by vitamin E supplementation. *Medicine and science in sports and exercise*. 34:798-805.
- Beaton, L.J., M.A. Tarnopolsky, and S.M. Phillips. 2002b. Contraction-induced muscle damage in humans following calcium channel blocker administration. *The Journal of physiology*. 544:849-859.
- Begue, G., A. Douillard, O. Galbes, B. Rossano, B. Vernus, R. Candau, and G. Py. 2013. Early activation of rat skeletal muscle IL-6/STAT1/STAT3 dependent gene expression in resistance exercise linked to hypertrophy. *PloS one*. 8:e57141.
- Bernik, T.R., S.G. Friedman, M. Ochani, R. DiRaimo, L. Ulloa, H. Yang, S. Sudan, C.J. Czura, S.M. Ivanova, and K.J. Tracey. 2002. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *The Journal of experimental medicine*. 195:781-788.
- Borovikova, L.V., S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G.I. Botchkina, L.R. Watkins, H. Wang, N. Abumrad, J.W. Eaton, and K.J. Tracey. 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 405:458-462.
- Brigitte, M., C. Schilte, A. Plonquet, Y. Baba-Amer, A. Henri, C. Charlier, S. Tajbakhsh, M. Albert, R.K. Gherardi, and F. Chretien. 2010. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis and rheumatism*. 62:268-279.

- Briken, V., and D.M. Mosser. 2011. Editorial: switching on arginase in M2 macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 90:839-841.
- Butterfield, T.A., T.M. Best, and M.A. Merrick. 2006. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *Journal of athletic training*. 41:457-465.
- Chazaud, B., M. Brigitte, H. Yacoub-Youssef, L. Arnold, R. Gherardi, C. Sonnet, P. Lafuste, and F. Chretien. 2009. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exercise and sport sciences reviews*. 37:18-22.
- Chazaud, B., F. Chretien, and R.K. Gherardi. 2007. [Macrophages regulate skeletal muscle regeneration]. *Medecine sciences : M/S*. 23:794-795.
- Chazaud, B., C. Sonnet, P. Lafuste, G. Bassez, A.C. Rimaniol, F. Poron, F.J. Authier, P.A. Dreyfus, and R.K. Gherardi. 2003. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *The Journal of cell biology*. 163:1133-1143.
- Chen, S.E., B. Jin, and Y.P. Li. 2007a. TNF-alpha regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *American journal of physiology. Cell physiology*. 292:C1660-1671.
- Chen, W., P.A. Ruell, M. Ghoddusi, A. Kee, E.C. Hardeman, K.M. Hoffman, and M.W. Thompson. 2007b. Ultrastructural changes and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ regulation in red vastus muscle following eccentric exercise in the rat. *Experimental physiology*. 92:437-447.
- Cheng, M., M.H. Nguyen, G. Fantuzzi, and T.J. Koh. 2008. Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. *American journal of physiology. Cell physiology*. 294:C1183-1191.
- Child, R., S. Brown, S. Day, A. Donnelly, H. Roper, and J. Saxton. 1999. Changes in indices of antioxidant status, lipid peroxidation and inflammation in human skeletal muscle after eccentric muscle actions. *Clinical science*. 96:105-115.
- Cho, K.W., D.L. Morris, and C.N. Lumeng. 2014. Flow cytometry analyses of adipose tissue macrophages. *Methods in enzymology*. 537:297-314.
- Chrousos, G.P., and T. Kino. 2005. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2005:pe48.

- Collins, R.A., and M.D. Grounds. 2001. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF-alpha(-/-) and TNF-alpha(-/-)/LT-alpha(-/-) mice. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 49:989-1001.
- Contreras-Shannon, V., O. Ochoa, S.M. Reyes-Reyna, D. Sun, J.E. Michalek, W.A. Kuziel, L.M. McManus, and P.K. Shireman. 2007. Fat accumulation with altered inflammation and regeneration in skeletal muscle of CCR2-/- mice following ischemic injury. *American journal of physiology. Cell physiology*. 292:C953-967.
- Crameri, R.M., P. Aagaard, K. Qvortrup, H. Langberg, J. Olesen, and M. Kjaer. 2007. Myofibre damage in human skeletal muscle: effects of electrical stimulation versus voluntary contraction. *The Journal of physiology*. 583:365-380.
- Crocker, B.A., D.L. Krebs, J.G. Zhang, S. Wormald, T.A. Willson, E.G. Stanley, L. Robb, C.J. Greenhalgh, I. Forster, B.E. Clausen, N.A. Nicola, D. Metcalf, D.J. Hilton, A.W. Roberts, and W.S. Alexander. 2003. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nature immunology*. 4:540-545.
- da Rocha, A.L., B.C. Pereira, J.R. Pauli, C.T. de Souza, G.R. Teixeira, F.S. Lira, D.E. Cintra, E.R. Ropelle, C.R. Junior, and A.S. da Silva. 2016. Downhill Running Excessive Training Inhibits Hypertrophy in Mice Skeletal Muscles with Different Fiber Type Composition. *Journal of cellular physiology*. 231:1045-1056.
- De Rossi, M., P. Bernasconi, F. Baggi, R. de Waal Malefyt, and R. Mantegazza. 2000. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *International immunology*. 12:1329-1335.
- Delp, M.D., C. Duan, C.A. Ray, and R.B. Armstrong. 1999. Rat hindlimb muscle blood flow during level and downhill locomotion. *Journal of applied physiology*. 86:564-568.
- Deng, B., M. Wehling-Henricks, S.A. Villalta, Y. Wang, and J.G. Tidball. 2012. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *Journal of immunology*. 189:3669-3680.
- Deyhle, M.R., A.M. Gier, K.C. Evans, D.L. Eggett, W.B. Nelson, A.C. Parcell, and R.D. Hyldahl. 2015. Skeletal Muscle Inflammation Following Repeated Bouts of Lengthening Contractions in Humans. *Frontiers in physiology*. 6:424.

- Dijkstra, C.D., E.A. Dopp, P. Joling, and G. Kraal. 1985. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Advances in experimental medicine and biology*. 186:409-419.
- Dong, Y., K.A. Silva, Y. Dong, and L. Zhang. 2014. Glucocorticoids increase adipocytes in muscle by affecting IL-4 regulated FAP activity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 28:4123-4132.
- Farmawati, A., Y. Kitajima, T. Nedachi, M. Sato, M. Kanzaki, and R. Nagatomi. 2013. Characterization of contraction-induced IL-6 up-regulation using contractile C2C12 myotubes. *Endocrine journal*. 60:137-147.
- Fernandez, R., G. Nardocci, C. Navarro, E.P. Reyes, C. Acuna-Castillo, and P.P. Cortes. 2014. Neural reflex regulation of systemic inflammation: potential new targets for sepsis therapy. *Frontiers in physiology*. 5:489.
- Galvan-Pena, S., and L.A. O'Neill. 2014. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Frontiers in immunology*. 5:420.
- Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 19:71-82.
- Geissmann, F., M.G. Manz, S. Jung, M.H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 327:656-661.
- Goh, J., E.A. Kirk, S.X. Lee, and W.C. Ladiges. 2012. Exercise, physical activity and breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. *Exercise immunology review*. 18:158-176.
- Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology*. 3:23-35.
- Gordon, S., and F.O. Martinez. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 32:593-604.
- Gordon, S., A. Pluddemann, and F. Martinez Estrada. 2014. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunological reviews*. 262:36-55.
- Gottfried, E., L.A. Kunz-Schughart, A. Weber, M. Rehli, A. Peuker, A. Muller, M. Kastenberger, G. Brockhoff, R. Andreesen, and M. Kreutz. 2008. Expression of

- CD68 in non-myeloid cell types. *Scandinavian journal of immunology*. 67:453-463.
- Haldar, M., and K.M. Murphy. 2014. Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages. *Immunological reviews*. 262:25-35.
- Hamann, N., T. Kohler, R. Muller, G.P. Bruggemann, and A. Niehoff. 2012. The effect of level and downhill running on cortical and trabecular bone in growing rats. *Calcified tissue international*. 90:429-437.
- Hardy, D., A. Besnard, M. Latil, G. Jouvion, D. Briand, C. Thepenier, Q. Pascal, A. Guguin, B. Gayraud-Morel, J.M. Cavaillon, S. Tajbakhsh, P. Rocheteau, and F. Chretien. 2016. Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PloS one*. 11:e0147198.
- Hayden, M.S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes & development*. 18:2195-2224.
- Heideveld, E., L.A. Hampton-O'Neil, S.J. Cross, F.P.J. van Alphen, M. van den Biggelaar, A.M. Toye, and E. van den Akker. 2018. Glucocorticoids induce differentiation of monocytes towards macrophages that share functional and phenotypical aspects with erythroblastic island macrophages. *Haematologica*. 103:395-405.
- Hellsten, Y., U. Frandsen, N. Orthenblad, B. Sjodin, and E.A. Richter. 1997. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *The Journal of physiology*. 498 (Pt 1):239-248.
- Heredia, J.E., L. Mukundan, F.M. Chen, A.A. Mueller, R.C. Deo, R.M. Locksley, T.A. Rando, and A. Chawla. 2013. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell*. 153:376-388.
- Hesse, M., M. Modolell, A.C. La Flamme, M. Schito, J.M. Fuentes, A.W. Cheever, E.J. Pearce, and T.A. Wynn. 2001. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *Journal of immunology*. 167:6533-6544.
- Hikida, R.S., R.S. Staron, F.C. Hagerman, W.M. Sherman, and D.L. Costill. 1983. Muscle fiber necrosis associated with human marathon runners. *Journal of the neurological sciences*. 59:185-203.

- Horsley, V., K.M. Jansen, S.T. Mills, and G.K. Pavlath. 2003. IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell*. 113:483-494.
- Hubal, M.J., T.C. Chen, P.D. Thompson, and P.M. Clarkson. 2008. Inflammatory gene changes associated with the repeated-bout effect. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 294:R1628-1637.
- Jacquemin, V., G.S. Butler-Browne, D. Furling, and V. Mouly. 2007. IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes. *Journal of cell science*. 120:670-681.
- Jones, D.A., D.J. Newham, J.M. Round, and S.E. Tolfree. 1986. Experimental human muscle damage: morphological changes in relation to other indices of damage. *The Journal of physiology*. 375:435-448.
- Karin, M., Y. Cao, F.R. Greten, and Z.W. Li. 2002. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature reviews. Cancer*. 2:301-310.
- Kawanishi, N., T. Mizokami, H. Niihara, K. Yada, and K. Suzuki. 2016. Macrophage depletion by clodronate liposome attenuates muscle injury and inflammation following exhaustive exercise. *Biochemistry and biophysics reports*. 5:146-151.
- Kawanishi, N., H. Yano, T. Mizokami, M. Takahashi, E. Oyanagi, and K. Suzuki. 2012. Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. *Brain, behavior, and immunity*. 26:931-941.
- Kawanishi, N., H. Yano, Y. Yokogawa, and K. Suzuki. 2010. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exercise immunology review*. 16:105-118.
- Kharraz, Y., J. Guerra, C.J. Mann, A.L. Serrano, and P. Munoz-Canoves. 2013. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators of inflammation*. 2013:491497.
- Kino, T., and G.P. Chrousos. 2004. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and associated diseases. *Essays in biochemistry*. 40:137-155.
- Lang, R., A.L. Pauleau, E. Parganas, Y. Takahashi, J. Mages, J.N. Ihle, R. Rutschman, and P.J. Murray. 2003. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nature immunology*. 4:546-550.

- Lapointe, B.M., J. Frenette, and C.H. Cote. 2002. Lengthening contraction-induced inflammation is linked to secondary damage but devoid of neutrophil invasion. *Journal of applied physiology*. 92:1995-2004.
- Laskin, D.L. 2009. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. *Chemical research in toxicology*. 22:1376-1385.
- Lauritzen, F., G. Paulsen, T. Raastad, L.H. Bergersen, and S.G. Owe. 2009. Gross ultrastructural changes and necrotic fiber segments in elbow flexor muscles after maximal voluntary eccentric action in humans. *Journal of applied physiology*. 107:1923-1934.
- Leite, P.E., J. Lagrota-Candido, L. Moraes, L. D'Elia, D.F. Pinheiro, R.F. da Silva, E.N. Yamasaki, and T. Quirico-Santos. 2010. Nicotinic acetylcholine receptor activation reduces skeletal muscle inflammation of mdx mice. *Journal of neuroimmunology*. 227:44-51.
- Lemos, D.R., F. Babaeijandaghi, M. Low, C.K. Chang, S.T. Lee, D. Fiore, R.H. Zhang, A. Natarajan, S.A. Nedospasov, and F.M. Rossi. 2015. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nature medicine*. 21:786-794.
- Lewis, P.B., D. Ruby, and C.A. Bush-Joseph. 2012. Muscle soreness and delayed-onset muscle soreness. *Clinics in sports medicine*. 31:255-262.
- Li, Y.P. 2003. TNF-alpha is a mitogen in skeletal muscle. *American journal of physiology. Cell physiology*. 285:C370-376.
- Llovera, M., N. Carbo, J. Lopez-Soriano, C. Garcia-Martinez, S. Busquets, B. Alvarez, N. Agell, P. Costelli, F.J. Lopez-Soriano, A. Celada, and J.M. Argiles. 1998. Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. *Cancer letters*. 133:83-87.
- Lonard, D.M., R.B. Lanz, and B.W. O'Malley. 2007. Nuclear receptor coregulators and human disease. *Endocrine reviews*. 28:575-587.
- Lu, A., J.D. Proto, L. Guo, Y. Tang, M. Lavasani, J.S. Tilstra, L.J. Niedernhofer, B. Wang, D.C. Guttridge, P.D. Robbins, and J. Huard. 2012. NF-kappaB negatively impacts the myogenic potential of muscle-derived stem cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 20:661-668.
- Lu, H., D. Huang, R.M. Ransohoff, and L. Zhou. 2011a. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair.

- FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 25:3344-3355.
- Lu, H., D. Huang, N. Saederup, I.F. Charo, R.M. Ransohoff, and L. Zhou. 2011b. Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 25:358-369.
- Manfredi, T.G., R.A. Fielding, K.P. O'Reilly, C.N. Meredith, H.Y. Lee, and W.J. Evans. 1991. Plasma creatine kinase activity and exercise-induced muscle damage in older men. *Medicine and science in sports and exercise*. 23:1028-1034.
- Mantegazza, R., S.M. Hughes, D. Mitchell, M. Travis, H.M. Blau, and L. Steinman. 1991. Modulation of MHC class II antigen expression in human myoblasts after treatment with IFN-gamma. *Neurology*. 41:1128-1132.
- Mantovani, A., T. Schioppa, S.K. Biswas, F. Marchesi, P. Allavena, and A. Sica. 2003. Tumor-associated macrophages and dendritic cells as prototypic type II polarized myeloid populations. *Tumori*. 89:459-468.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 25:677-686.
- Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 23:549-555.
- Martinez, C.O., M.J. McHale, J.T. Wells, O. Ochoa, J.E. Michalek, L.M. McManus, and P.K. Shireman. 2010. Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 299:R832-842.
- Massimino, M.L., E. Rapizzi, M. Cantini, L.D. Libera, F. Mazzoleni, P. Arslan, and U. Carraro. 1997. ED2+ macrophages increase selectively myoblast proliferation in muscle cultures. *Biochemical and biophysical research communications*. 235:754-759.
- Matsumoto, H., Y. Kumon, H. Watanabe, T. Ohnishi, M. Shudou, C. Ii, H. Takahashi, Y. Imai, and J. Tanaka. 2007. Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label

- neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions. *Journal of neuroscience research*. 85:994-1009.
- McLennan, I.S. 1996. Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. *Journal of anatomy*. 188 (Pt 1):17-28.
- Merly, F., L. Lescaudron, T. Rouaud, F. Crossin, and M.F. Gardahaut. 1999. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle & nerve*. 22:724-732.
- Minari, A.L., L.M. Oyama, and R.V. Dos Santos. 2015. Downhill exercise-induced changes in gene expression related with macrophage polarization and myogenic cells in the triceps long head of rats. *Inflammation*. 38:209-217.
- Minari, A.L.A., L.M. Oyama, and R.V.T. Dos Santos. 2017. The Secretory Leukocyte Protease Inhibitor mRNA expression is involved with inflammatory control after downhill exercise in the triceps brachii intermediary head in Wistar rats. *Journal of muscle research and cell motility*. 38:231-239.
- Moestrup, S.K., and H.J. Moller. 2004. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Annals of medicine*. 36:347-354.
- Mounier, R., M. Theret, L. Arnold, S. Cuvellier, L. Bultot, O. Goransson, N. Sanz, A. Ferry, K. Sakamoto, M. Foretz, B. Viollet, and B. Chazaud. 2013. AMPK α 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. *Cell metabolism*. 18:251-264.
- Nader, N., S.S. Ng, G.I. Lambrou, P. Pervanidou, Y. Wang, G.P. Chrousos, and T. Kino. 2010. AMPK regulates metabolic actions of glucocorticoids by phosphorylating the glucocorticoid receptor through p38 MAPK. *Molecular endocrinology*. 24:1748-1764.
- Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature*. 420:846-852.
- Nikolaidis, M.G., A.Z. Jamurtas, V. Paschalis, I.G. Fatouros, Y. Koutedakis, and D. Kouretas. 2008. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports medicine*. 38:579-606.
- Odaka, C., T. Mizuochi, J. Yang, and A. Ding. 2003. Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during clearance of apoptotic cells:

- implications for resolution of the inflammatory response. *Journal of immunology*. 171:1507-1514.
- Osborne-Hereford, A.V., S.W. Rogers, and L.C. Gahring. 2008. Neuronal nicotinic alpha7 receptors modulate inflammatory cytokine production in the skin following ultraviolet radiation. *Journal of neuroimmunology*. 193:130-139.
- Parada, E., J. Egea, I. Buendia, P. Negredo, A.C. Cunha, S. Cardoso, M.P. Soares, and M.G. Lopez. 2013. The microglial alpha7-acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2. *Antioxidants & redox signaling*. 19:1135-1148.
- Paulsen, G., R. Cramer, H.B. Benestad, J.G. Fjeld, L. Morkrid, J. Hallen, and T. Raastad. 2010a. Time course of leukocyte accumulation in human muscle after eccentric exercise. *Medicine and science in sports and exercise*. 42:75-85.
- Paulsen, G., I.M. Egner, M. Drange, H. Langberg, H.B. Benestad, J.G. Fjeld, J. Hallen, and T. Raastad. 2010b. A COX-2 inhibitor reduces muscle soreness, but does not influence recovery and adaptation after eccentric exercise. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 20:e195-207.
- Paulsen, G., U.R. Mikkelsen, T. Raastad, and J.M. Peake. 2012. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exercise immunology review*. 18:42-97.
- Pedersen, B.K., T.C. Akerstrom, A.R. Nielsen, and C.P. Fischer. 2007. Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal of applied physiology*. 103:1093-1098.
- Pedersen, B.K., A. Steensberg, C. Fischer, C. Keller, P. Keller, P. Plomgaard, M. Febbraio, and B. Saltin. 2003. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *Journal of muscle research and cell motility*. 24:113-119.
- Pedersen, B.K., A. Steensberg, C. Fischer, C. Keller, P. Keller, P. Plomgaard, E. Wolsk-Petersen, and M. Febbraio. 2004. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *The Proceedings of the Nutrition Society*. 63:263-267.

- Petersen, A.M., and B.K. Pedersen. 2006. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 57 Suppl 10:43-51.
- Prokopchuk, O., Y. Liu, L. Wang, K. Wirth, D. Schmidtbleicher, and J.M. Steinacker. 2007. Skeletal muscle IL-4, IL-4Ralpha, IL-13 and IL-13Ralpha1 expression and response to strength training. *Exercise immunology review*. 13:67-75.
- Proske, U., and T.J. Allen. 2005. Damage to skeletal muscle from eccentric exercise. *Exercise and sport sciences reviews*. 33:98-104.
- Proske, U., and D.L. Morgan. 2001. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *The Journal of physiology*. 537:333-345.
- Puri, P.L., Z. Wu, P. Zhang, L.D. Wood, K.S. Bhakta, J. Han, J.R. Feramisco, M. Karin, and J.Y. Wang. 2000. Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes & development*. 14:574-584.
- Reyes-Reyna, S.M., and K.A. Krollick. 2000. Chemokine production by rat myocytes exposed to interferon-gamma. *Clinical immunology*. 94:105-113.
- Rosa Neto, J.C., F.S. Lira, N.E. Zanchi, L.M. Oyama, G.D. Pimentel, R.V. Santos, M. Seelaender, and C.M. Oller do Nascimento. 2011. Acute exhaustive exercise regulates IL-2, IL-4 and MyoD in skeletal muscle but not adipose tissue in rats. *Lipids in health and disease*. 10:97.
- Round, J.M., D.A. Jones, and G. Cambridge. 1987. Cellular infiltrates in human skeletal muscle: exercise induced damage as a model for inflammatory muscle disease? *Journal of the neurological sciences*. 82:1-11.
- Saeed, R.W., S. Varma, T. Peng-Nemeroff, B. Sherry, D. Balakhaneh, J. Huston, K.J. Tracey, Y. Al-Abed, and C.N. Metz. 2005. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 201:1113-1123.
- Schakman, O., M. Dehoux, S. Bouchuari, S. Delaere, P. Lause, N. Decroly, S.E. Shoelson, and J.P. Thissen. 2012. Role of IGF-I and the TNFalpha/NF-kappaB pathway in the induction of muscle atrogenes by acute inflammation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 303:E729-739.

- Schakman, O., S. Kalista, C. Barbe, A. Loumave, and J.P. Thissen. 2013. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 45:2163-2172.
- Serrano, A.L., B. Baeza-Raja, E. Perdiguero, M. Jardi, and P. Munoz-Canoves. 2008. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell metabolism*. 7:33-44.
- Sherman, W.M., L.E. Armstrong, T.M. Murray, F.C. Hagerman, D.L. Costill, R.C. Staron, and J.L. Ivy. 1984. Effect of a 42.2-km footrace and subsequent rest or exercise on muscular strength and work capacity. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 57:1668-1673.
- Shireman, P.K., V. Contreras-Shannon, O. Ochoa, B.P. Karia, J.E. Michalek, and L.M. McManus. 2007. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *Journal of leukocyte biology*. 81:775-785.
- Singh, D.P., Z. Barani Lonbani, M.A. Woodruff, T.J. Parker, R. Steck, and J.M. Peake. 2017. Effects of Topical Icing on Inflammation, Angiogenesis, Revascularization, and Myofiber Regeneration in Skeletal Muscle Following Contusion Injury. *Frontiers in physiology*. 8:93.
- Smith, L.L. 1991. Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? *Medicine and science in sports and exercise*. 23:542-551.
- Sulahian, T.H., P. Hogger, A.E. Wahner, K. Wardwell, N.J. Goulding, C. Sorg, A. Droste, M. Stehling, P.K. Wallace, P.M. Morganelli, and P.M. Guyre. 2000. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine*. 12:1312-1321.
- Taggart, C.C., S.A. Cryan, S. Weldon, A. Gibbons, C.M. Greene, E. Kelly, T.B. Low, J. O'Neill S, and N.G. McElvaney. 2005. Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *The Journal of experimental medicine*. 202:1659-1668.
- Taggart, C.C., C.M. Greene, N.G. McElvaney, and S. O'Neill. 2002. Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced IkappaBalpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination. *The Journal of biological chemistry*. 277:33648-33653.
- Thomason, D.B., and F.W. Booth. 1990. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *Journal of applied physiology*. 68:1-12.

- Tidball, J.G. 1995. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Medicine and science in sports and exercise*. 27:1022-1032.
- Tidball, J.G. 2017. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nature reviews. Immunology*. 17:165-178.
- Tidball, J.G., and S.A. Villalta. 2010. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 298:R1173-1187.
- Tidball, J.G., and M. Wehling-Henricks. 2007. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *The Journal of physiology*. 578:327-336.
- Tonkin, J., L. Temmerman, R.D. Sampson, E. Gallego-Colon, L. Barberi, D. Bilbao, M.D. Schneider, A. Musaro, and N. Rosenthal. 2015. Monocyte/Macrophage-derived IGF-1 Orchestrates Murine Skeletal Muscle Regeneration and Modulates Autocrine Polarization. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 23:1189-1200.
- Tsivitse, S.K., T.J. McLoughlin, J.M. Peterson, E. Mylona, S.J. McGregor, and F.X. Pizza. 2003. Downhill running in rats: influence on neutrophils, macrophages, and MyoD+ cells in skeletal muscle. *European journal of applied physiology*. 90:633-638.
- Umemura, N., M. Saio, T. Suwa, Y. Kitoh, J. Bai, K. Nonaka, G.F. Ouyang, M. Okada, M. Balazs, R. Adany, T. Shibata, and T. Takami. 2008. Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *Journal of leukocyte biology*. 83:1136-1144.
- Urso, M.L., Y.W. Chen, A.G. Scrimgeour, P.C. Lee, K.F. Lee, and P.M. Clarkson. 2007. Alterations in mRNA expression and protein products following spinal cord injury in humans. *The Journal of physiology*. 579:877-892.
- Van Dyken, S.J., and R.M. Locksley. 2013. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annual review of immunology*. 31:317-343.
- van Maanen, M.A., M.C. Lebre, T. van der Poll, G.J. LaRosa, D. Elbaum, M.J. Vervoordeldonk, and P.P. Tak. 2009. Stimulation of nicotinic acetylcholine

- receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis and rheumatism*. 60:114-122.
- Varga, T., R. Mounier, A. Horvath, S. Cuvellier, F. Dumont, S. Poliska, H. Ardjoune, G. Juban, L. Nagy, and B. Chazaud. 2016a. Highly Dynamic Transcriptional Signature of Distinct Macrophage Subsets during Sterile Inflammation, Resolution, and Tissue Repair. *Journal of immunology*. 196:4771-4782.
- Varga, T., R. Mounier, A. Patsalos, P. Gogolak, M. Peloquin, A. Horvath, A. Pap, B. Daniel, G. Nagy, E. Pintye, S. Poliska, S. Cuvellier, S.B. Larbi, B.E. Sansbury, M. Spite, C.W. Brown, B. Chazaud, and L. Nagy. 2016b. Macrophage PPARgamma, a Lipid Activated Transcription Factor Controls the Growth Factor GDF3 and Skeletal Muscle Regeneration. *Immunity*. 45:1038-1051.
- Verma, I.M., J.K. Stevenson, E.M. Schwarz, D. Van Antwerp, and S. Miyamoto. 1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & development*. 9:2723-2735.
- Villalta, S.A., H.X. Nguyen, B. Deng, T. Gotoh, and J.G. Tidball. 2009. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Human molecular genetics*. 18:482-496.
- Villalta, S.A., C. Rinaldi, B. Deng, G. Liu, B. Fedor, and J.G. Tidball. 2011. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Human molecular genetics*. 20:790-805.
- Wang, D.W., Y.M. Yin, and Y.M. Yao. 2016. Vagal Modulation of the Inflammatory Response in Sepsis. *International reviews of immunology*. 35:415-433.
- Warren, G.L., T. Hulderman, D. Mishra, X. Gao, L. Millecchia, L. O'Farrell, W.A. Kuziel, and P.P. Simeonova. 2005. Chemokine receptor CCR2 involvement in skeletal muscle regeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 19:413-415.
- Washington, T.A., J.P. White, J.M. Davis, L.B. Wilson, L.L. Lowe, S. Sato, and J.A. Carson. 2011. Skeletal muscle mass recovery from atrophy in IL-6 knockout mice. *Acta physiologica*. 202:657-669.

- Wehling, M., M.J. Spencer, and J.G. Tidball. 2001. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *The Journal of cell biology*. 155:123-131.
- Wu, D., A.B. Molofsky, H.E. Liang, R.R. Ricardo-Gonzalez, H.A. Jouihan, J.K. Bando, A. Chawla, and R.M. Locksley. 2011. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*. 332:243-247.
- Yasukawa, H., M. Ohishi, H. Mori, M. Murakami, T. Chinen, D. Aki, T. Hanada, K. Takeda, S. Akira, M. Hoshijima, T. Hirano, K.R. Chien, and A. Yoshimura. 2003. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nature immunology*. 4:551-556.
- Yu, S.H., C.Y. Huang, S.D. Lee, M.F. Hsu, R.Y. Wang, C.L. Kao, and C.H. Kuo. 2014. Decreased eccentric exercise-induced macrophage infiltration in skeletal muscle after supplementation with a class of ginseng-derived steroids. *PloS one*. 9:e114649.
- Zuo, Q., S.C. Wang, X.K. Yu, and W.W. Chao. 2018. Response of macrophages in rat skeletal muscle after eccentric exercise. *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi*. 21:88-95.